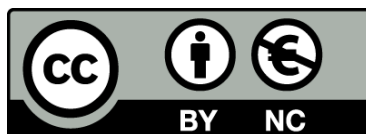




UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

# Efectos del trasplante de células madre en un modelo experimental de Fibrosis Pulmonar

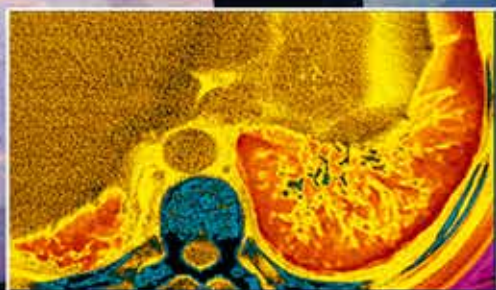
Daniel López Fernández



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License.**



# **Efectos del trasplante de células madre en un modelo experimental de Fibrosis Pulmonar**

**TESIS DOCTORAL**

Daniel López Fernández



Título de la Tesis:

# **“Efectos del trasplante de células madre en un modelo experimental de Fibrosis Pulmonar”**

Airway trasplantation of Adipose Stem Cells protects against Bleomycin induced Pulmonary Fibrosis

Tesis Doctoral presentada por el Doctorando

**Daniel López Fernández**



---

Memoria de la Tesis Doctoral presentada por Daniel López Fernández  
para optar al Grado de Doctor en Medicina.

Trabajo realizado bajo la dirección del Prof. Dr. Laureano Molins López-Rodó y del  
Dr. Norberto Santana Rodríguez  
Tesis inscrita en el programa de Doctorado de Medicina  
Departamento de Medicina, Facultad de Medicina  
Universidad de Barcelona  
Barcelona, 2017

---



Título de la Tesis:

# **“Efectos del trasplante de células madre en un modelo experimental de Fibrosis Pulmonar”**

Tesis Doctoral presentada por el Doctorando

**Daniel López Fernández**

Dirigida por los Doctores:

**Dr. Laureano Molins López-Rodó**  
**Dr. Norberto Santana Rodríguez**

El Director,

A stylized signature in blue ink, likely belonging to the Director, Laureano Molins López-Rodó.

Codirector,

A stylized signature in blue ink, likely belonging to the Codirector, Norberto Santana Rodríguez.

El Doctorando,

A stylized signature in blue ink, likely belonging to the Doctorando, Daniel López Fernández.

Las Palmas de Gran Canaria, a 3 de Noviembre del 2017





DR. LAUREANO MOLINS LÓPEZ-RODÓ, DOCTOR EN MEDICINA, MÉDICO ESPECIALISTA EN CIRUGÍA TORÁCICA, CONSULTOR Y JEFE DE SERVICIO DE CIRUGÍA TORÁCICA DEL HOSPITAL CLÍNICA DE BARCELONA, PROFESOR ASOCIADO DE CIRUGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA,

CERTIFICA:

Que el trabajo de Investigación titulado: **"Efectos del trasplante de células madre en un modelo experimental de fibrosis pulmonar"**, ha sido realizado por D. Daniel López Fernández, bajo mi dirección y asesoramiento y, una vez revisada la presente memoria, la encuentro APTA para su defensa como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extendiendo el presente certificado en Barcelona, a 7 de Noviembre de 2017.

Dr. Laureano Molins

Consultor y Jefe de Servicio de Cirugía Torácica

Institut Clínic Respiratori, Hospital Clínic

Profesor Asociado de Cirugía

Universidad de Barcelona

CIF - G-08431173





مستشفى الملك فيصل التخصصي ومركز الأبحاث  
King Faisal Specialist Hospital & Research Centre  
مؤسسة عامة - Gen. Org.



INSTITUTO UNIVERSITARIO DE  
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS Y  
SANITARIAS

**Dr. NORBERTO SANTANA RODRÍGUEZ, MÉDICO ESPECIALISTA EN CIRUGÍA TORÁCICA, DOCTOR EN MEDICINA, JEFE CIRUGÍA TORÁCICA DEL KING FAISAL SPECIALIST HOSPITAL & RESEARCH CENTER E INVESTIGADOR PRINCIPAL DE LA LÍNEA DE MEDICINA REGENERATIVA DEL GRUPO BIOPHARM DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS Y SANITARIAS (IUIBS).**

**CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación titulado **“Efectos del trasplante de células madre en un modelo experimental de fibrosis pulmonar”** ha sido realizado por D. Daniel López Fernández bajo mi dirección y asesoramiento y una vez revisada la presente memoria la encuentro APTA para su defensa como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos extendiendo el presente certificado, en Riyadh, Arabia Saudi, a 6 de Noviembre de 2017.

Atentamente:

Dr. Norberto Santana Rodríguez, MD, PhD.  
Section Head of Thoracic Surgery. Department of Surgery. King Faisal Specialist Hospital and Research Center, Riyadh, Arabia Saudí.  
Investigador Principal del IUBIS, Grupo Biopharm, Las Palmas de Gran Canaria, España.



---

“Somos lo que hacemos día a día.  
De modo que la excelencia no es un acto sino un hábito”  
*Aristóteles, (384 ac-322 ac)*

“El resultado es un uno por ciento de inspiración  
y un noventa y nueve por ciento de transpiración”  
*Thomas Edison, (1847-1931 dc)*

---



---

En memoria de mis queridos padres, a los que tanto echo de menos.

A mi querido hijo Marc,

Al amor de mi vida, Marta,

A toda mi familia,

A mis amigos.

---





## AGRADECIMIENTOS

Mis padres me inculcaron el noble valor del trabajo bien hecho, del esfuerzo continuo, de perseguir los sueños. Siempre he intentado mantener y cumplir en mi vida dos valores fundamentales: la honestidad y la perseverancia.

*Ser honesto para comportarme y expresarme con coherencia y sinceridad.*

*Ser perseverante para tener firmeza y tesón en la consecución de un objetivo.*

Cuando uno es pequeño siempre piensa en lo que quiere ser de mayor, tienes dudas, no sabes el camino ni el rumbo que debes tomar, propio de la inmadurez del momento. Siempre lo tuve claro, quería dedicarme a las ciencias de la salud, y tenía claro que quería ser Fisioterapeuta. Mi vida siempre estuvo vinculada al estudio y al deporte, especialmente al baloncesto.

Una vez acabada la formación básica, accedes a la universidad para estudiar Fisioterapia ya estaba cumplido el primer sueño. Los años pasan, acabas la universidad y sales al mundo profesional donde el camino no ha hecho nada más que comenzar. Los inicios siempre son duros, mejoras, aprendes, desaprendes, siempre acompañado de tantos profesionales que pasan por tu vida y de los cuales te llevas un pequeño trocito de cada uno.

Alcanzar el grado de doctor es cumplir una meta, largamente trabajada, personal y profesional, el camino de la investigación, superar malos momentos, pero exigirte a ti mismo continuamente el deber del cumplimiento. Todos estos años de duro trabajo han perseguido el alcanzar la excelencia profesional, la que se obtiene de ser riguroso en el día a día, obsesivo y meticuloso en la búsqueda, sencillo en el planteamiento y complicada su ejecución.

Es el momento de dar las gracias a mucha gente, a todas esas personas que me han acompañado en este camino:

En primer lugar a mi director el Dr. Laureano Molins López-Rodó, el cual a pesar de la lejanía siempre se ha mostrado cercano, y dispuesto a ayudarme, sin el cual muchos momentos se hacen grandes a pesar de ser pequeños. Gracias “Laure”

A mi codirector, y amigo, Dr. Norberto Santana, por ofrecerme su inestimable apoyo, y ayuda a pesar de la distancia, has estado a mi lado.

Al Dr. Pedro Llontop, por todos y cada uno de los momentos de laboratorio, de incansables horas, de viajes ida y vuelta, sin tu ayuda este momento no hubiera llegado.

A la Dra. Fiuza Pérez, mi amiga Rula. Gracias por todas esas horas desde ya hace tantos años, tu firmeza me ha hecho crecer no sabes cuánto.

Al Dr. Leandro Fernández, del departamento de Ciencias Clínicas de la Facultad de Ciencias de la Salud de la ULPGC, por permitirme avanzar y facilitarme en todo momento su laboratorio.

Y a “Patri”, becaria del laboratorio, como no, sin ella y sus horas de laboratorio nada hubiera llegado hasta aquí.

Al Dr. Juan Luis Afonso, mi amigo Juan Luis, anatomopatólogo del Hospital Insular de Gran Canaria, gracias, muchas gracias por tu ayuda incondicional, no creía que podría y gracias a ti ha llegado el momento.

A la Dra. Carme Gomar, al Dr. Ricardo Pedro Casaroli, a todas las Secretarias que me han prestado su ayuda durante estos años: Laura Morte, Mariona de Torre y Laura Hernández, ya que siempre me han facilitado todas las gestiones.

A Ismael, del Grupo de investigación del Prof. Calbet, que me ayudó en un momento clave del proceso.

A mis grandes amigos Roque y Vicente, a todos mis amigos, los de antes y los de ahora.

A mis hermanos, a toda mi familia. Gracias a todos.

A mi hijo Marc, por ser la fuente de mi perseverancia. Te quiero.

Al amor de mi vida, Marta Ausiró, gracias por tu ejemplo, por tu apoyo incondicional en los malos momentos, por todos y cada uno de los momentos que hemos vivido juntos y que me hacen tan feliz. Te amo.

Mi último agradecimiento es especial, va dirigido a mis padres, a los que tanto echo de menos cada día. Todo este esfuerzo va por ellos, les prometí que lo alcanzaría y he cumplido. OS QUIERO

---

“Lo que hoy somos descansa en lo que ayer pensamos, y nuestros actuales pensamientos forjan nuestra vida futura”.

*Buda*

---



Esta Tesis Doctoral ha sido becada en las

**AYUDAS A LA INVESTIGACIÓN EPID - FUTURO 2013** de la **FUNDACIÓN RESPIRA** de  
la **SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NEUMOLOGÍA Y CIRUGÍA TORÁCICA (SEPAR)**





# INDICE

<b>35</b>	<b>I. INTRODUCCIÓN</b>
<b>37</b>	1.1 Fibrosis pulmonar idiopática
<b>37</b>	1.2 Definición
<b>37</b>	1.3 Incidencia y Prevalencia
<b>38</b>	1.4 Historia natural
<b>40</b>	1.5 Etiología y Factores de riesgo
<b>42</b>	1.6 Diagnóstico
<b>44</b>	1.6.1 Características clínicas y pruebas complementarias
<b>44</b>	1.6.2 Lavado broncoalveolar y biopsia transbronquial
<b>45</b>	1.6.3 Tomografía axial computerizada de alta resolución
<b>49</b>	1.6.4 Patrón histopatológico
<b>52</b>	1.6.5 Factores pronósticos
<b>53</b>	1.6.5.1 Desaturación en la prueba de marcha de los 6 minutos
<b>54</b>	1.6.5.2 Extensión de la fibrosis en la TACAR
<b>54</b>	1.6.5.3 Biomarcadores
<b>56</b>	1.7 Tratamiento
<b>56</b>	1.7.1 Tratamiento Farmacológico
<b>59</b>	1.7.2 Tratamiento No Farmacológico
<b>60</b>	1.7.3 Medidas generales
<b>61</b>	1.7.4 Oxigenoterapia crónica domiciliaria
<b>62</b>	1.7.5 Trasplante pulmonar
<b>63</b>	1.7.6 Rehabilitación Respiratoria
<b>66</b>	1.7.7 Terapia celular
<b>69</b>	1.7.8 Terapia génica
<b>71</b>	1.7.9 Cuidados paliativos
<b>73</b>	1.7.10 Ventilación Mecánica No Invasiva
<b>75</b>	<b>II FUTURO DE LA INVESTIGACIÓN EN FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA</b>
<b>81</b>	<b>III JUSTIFICACIÓN</b>
<b>85</b>	<b>IV OBJETIVOS</b>



89	<b>V MATERIAL y MÉTODO</b>
91	5.1 Diseño del estudio
92	5.2 Modelo experimental
93	5.2.1 Inducción a la Fibrosis Pulmonar
96	5.2.2 Escala de valoración del grado de fibrosis pulmonar. Escala de Ashcroft
97	5.3 Animales de experimentación
99	5.4 Salas, equipos y material inventariable
100	5.5 Material quirúrgico
100	5.6 Medicación anestésica y analgésica
100	5.7 Material utilizado para mediciones
101	5.8 Recogida y análisis de resultados
101	5.8.1 Procesamiento de las muestras
101	5.8.2 Mediciones
101	5.8.2.1 Respuesta clínica
101	5.8.2.2 Estudio histológico
102	5.8.2.3 Determinaciones génicas
102	5.9 Análisis estadístico
105	<b>VI RESULTADOS</b>
107	6.1 Evolución clínica postoperatoria
109	6.2 Descripción macroscópica de los pulmones
111	6.3 Determinaciones histológicas
113	6.3.1 Valoración del grado de fibrosis según Escala de Ashcroft
115	6.4 Análisis Microbiológico
115	6.5 Análisis de la expresión génica por RT-PCR
115	6.5.1 Grupo Control vs Resto de grupos
133	<b>VII DISCUSIÓN</b>
147	<b>VIII CONCLUSIONES</b>
153	<b>IX BIBLIOGRAFÍA</b>
165	<b>X ANEXOS</b>

## INDICE DE FIGURAS

**Fig. 1** Representación del curso clínico de la FPI

**Fig. 2** Comparación de la tasa de supervivencia a 5 años y las neoplasias más comunes

**Fig. 3** Representación de los procesos celulares que tienen lugar durante el proceso de fibrosis en un alveolo pulmonar

**Fig. 4** Corte de TACAR a nivel de las bases pulmonares mostrando un patrón reticular de localización subpleural y la presencia de múltiples quistes de pequeño tamaño que representan áreas de panalización asociada (flechas)

**Fig. 5** Pulmón mostrando imagen de “panal de abeja”

**Fig. 6** Criterios funcionales de la FPI leve a moderada

**Fig. 7** Principales tipos de células madre mesenquimales para la reparación pulmonar

**Fig. 8 Grupo Control.** A los que no se les realizó ningún tratamiento experimental.

**Fig. 9 Grupo Sham.** Animales a los que se les ha instilado suero fisiológico por vía intratraqueal en el día 0.

**Fig. 10 Grupo BLM.** Animales a los que se les ha instilado BLM (2,5 mg/Kg de peso) en dosis única por vía intratraqueal en el día 0.

**Fig. 11 Grupo BLM+ADSC-2d.** Animales a los que se les ha aplicado ADSC por vía intratraqueal a los 2 días de instilarle la dosis única de BLM. Los animales fueron sacrificados a los 28 días de instilarle la BLM (día 0).

**Fig. 12 Grupo BLM+ADSC-14d.** Animales a los que se les ha aplicado ADSC por vía intratraqueal a los 14 días de instilarle la dosis única de BLM. Los animales fueron sacrificados a los 28 días de instilarle la BLM (día 0).

**Fig. 13** Diferentes imágenes de severidad de fibrosis según escala de Ashcroft

**Fig. 14** Rata de la cepa Sprague-Dawley

**Fig. 15** Quirófano de la Unidad de investigación del HUGC Dr. Negrín

**Fig. 16** Imagen de intubación de una de los animales del estudio

**Fig. 17** Diferencia de pesos por grupo de estudio entre el inicio y final del estudio

**Fig. 18** Bloque pulmonar de un animal del grupo Sham

**Fig. 19** Bloque pulmonar de un animal del grupo BLM

**Fig. 20** Bloque pulmonar de un animal del grupo BLM+ADSC-2d

**Fig. 21** Bloque pulmonar de un animal del grupo BLM+ADSC-14d

**Fig. 22** Vista histológica de pulmón de un animal del grupo Sham

**Fig. 23** Vista histológica de pulmón de un animal del grupo BLM

**Fig. 24** Vista histológica de pulmón de un animal del grupo BLM+ADSC-2d

**Fig. 25** Vista histológica de pulmón de un animal del grupo BLM+ADSC-14d

**Fig.26** Valor medio de la cuantificación de la fibrosis según Escala de Ashcroft

**Fig.27** Gráfico de la evolución de la fibrosis según Escala de Ashcroft

**Fig.28** Expresión de los genes analizados entre Control vs Sham

**Fig.29** Expresión de los genes analizados entre Control vs BLM.

**Fig.30** Expresión de los genes analizados entre el grupo Control vs BLM+ADSC-2d

**Fig.31** Expresión de los genes analizados entre el grupo Control vs BLM+ADSC-14d

**Fig.32** Expresión de los genes analizados entre el grupo Sham vs BLM

**Fig.33** Expresión de los genes analizados entre el grupo Control vs BLM+ADSC-2d

**Fig.34** Expresión de los genes analizados entre el grupo Sham vs BLM+ADSC-14d

**Fig.35** Expresión de los genes analizados entre el grupo BLM vs BLM+ADSC-2d

**Fig.36** Expresión de los genes analizados entre el grupo BLM vs BLM+ADSC-14d

**FIG.37** Expresión individual del gen Hsp27

**Fig.38** Expresión individual del gen Vegfa

**Fig.39** Expresión individual del gen NFkB

**Fig.40** Expresión individual del gen IL 6

**Fig.41** Expresión individual del gen COL 4

**Fig.42** Expresión individual del gen IL 1

**Fig.43** Expresión individual del gen Tgfβ1

## INDICE DE TABLAS

**Tabla 1** Disminución de la Capacidad Vital Forzada y supervivencia

**Tabla 2** TACAR Hallazgos considerados excluyentes de un patrón de NIU\*.

**Tabla 3** Hallazgos de la TACAR sugestivos de Fibrosis

**Tabla 4** Patrón de neumonía intersticial usual. Criterios histopatológicos.

**Tabla 5** Variables predictores de supervivencia.

**Tabla 6** Grupos de estudio

**Tabla 7** Escala de Ashcroft. Criterios para establecer el grado de fibrosis.

**Tabla 8** Tiempo de recuperación al peso inicial del estudio, después de instilación de BLM

**Tabla 9** Expresión de los genes analizados entre el grupo Control vs Sham

**Tabla 10** Expresión de los genes analizados entre el grupo Control vs BLM

**Tabla 11** Expresión de los genes analizados entre el grupo Control vs BLM+ADSC-2d

**Tabla 12** Expresión de los genes analizados entre el grupo Control vs BLM+ADSC-14d

**Tabla 13** Expresión de los genes analizados entre el grupo Sham vs BLM

**Tabla 14** Expresión de los genes analizados entre el grupo Sham vs BLM+ADSC-2d

**Tabla 15** Expresión de los genes analizados entre el grupo Sham vs BLM+ADSC-14d

**Tabla 16** Expresión de los genes analizados entre el grupo BLM vs BLM+ADSC-2d

**Tabla 17** Expresión de los genes analizados entre el grupo BLM vs BLM+ADSC-14d

**Tabla 18** Expresión individual del gen HSP 27

**Tabla 19** Expresión individual del gen Vegfa

**Tabla 20** Expresión individual del gen NFkB

**Tabla 21** Expresión individual del gen IL 6

**Tabla 22** Expresión individual del gen COL 4

**Tabla 23** Expresión individual del gen IL 1

**Tabla 24** Expresión individual del gen Tgfβ1

ABREVIATURAS	
ATI	Alveolar Type I cells
ATII	Alveolar Type II cells
ADSC	Células madre de tejido adiposo
ALAT	Asociación Latinoamericana de Respiratorio
ATS	American Thoracic Society
ASCEND	Assesment of Pirfenidone to confirm Efficacy and Safety in IPF
BLM	Bleomicina
BPQ	Biopsia Pulmonar Quirúrgica
CAPACITY	Clinical Studies Assessing Pirfenidone in IPF: Research of Efficacy and Safety Outcomes
CSIC	Centro Superior de Investigaciones Científicas
CVF	Capacidad Vital Forzada
CVRS	Calidad de vida relacionada con la salud
DMCI	Diferencia Mínima clínicamente importante
DLCO	Difusión
EGF	Factor de Crecimiento Epidermico
EMA	European Medicaments Agency
EO	Estrés Oxidativo
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
EPID	Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa
ERO	Especies reactivas del oxígeno
ERS	European Respiratory Society
FDA	Federal Drugs Agency
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FP	Fibrosis Pulmonar
FPI	Fibrosis Pulmonar Idiopática
FPF	Fibrosis Pulmonar Familiar
HAP	Hipertensión arterial Pulmonar
HSP 27	Proteína del shock térmico
ICF	Indice Compuesto Fisiológico
IL 1	Interleukina 1
IL 6	Interleukina 6

IOT	Intubación orotraqueal
IV	Intravenosa
JRS	Japanese Respiratory Society
LBA	Lavado Broncoalveolar
MEC	Matriz extracelular
MRC	Medical Research Council
MSC	Células Madre Mesenquimales
NAC	N-Acetilcisteína
NFkB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NHLBI	National Heart, Lung and Blood Institute
NII	Neumonías intersticiales idiopáticas
NIU	Neumonía Intersticial Usual
O3	Ozono
OCD	Oxigenoterapia Crónica Domiciliaria
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PM6M	Prueba de la marcha de los 6 minutos
RR	Rehabilitación Respiratoria
ROSE	Sistema de estratificación de riesgo
SC	Stem cells
SGRQ	Cuestionario respiratorio de Saint George
SNP	Single-nucleotide polymorphism
TAC	Tomografía Computerizada
TACAR	Tomografía computerizada de alta resolución.
UAM	Universidad Autónoma de Madrid
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VO2 MAX	Consumo máximo de oxígeno



## RESUMEN

**Introducción:** la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es una enfermedad intersticial de mal pronóstico y una indicación de trasplante pulmonar. Actualmente, no existe un tratamiento médico curativo o capaz de cambiar el curso evolutivo de esta enfermedad. Las células madres (SC) presentan propiedades regenerativas e inmunomoduladoras y podrían ser una opción de tratamiento.

**Objetivo:** evaluar las propiedades protectoras de las SC derivadas de tejido adiposo (ADSC) en un modelo experimental de Fibrosis Pulmonar (FP) inducida con bleomicina (BLM).

**Método:** Se analizaron 58 pulmones de 29 ratas macho Sprague-Dawley. Los animales se dividieron al azar en 5 grupos: a) Control (n=3); b) Sham (n=6); c) BLM (n=6); d) BLM+ADSC-2d (n=6); e) BLM+ADSC-14d (n=8). La BLM se administró por vía traqueal: 2,5UI/kg en 500µl de suero fisiológico (SF). Los animales Sham recibieron 500µl de SF por vía traqueal. Las ADSC ( $2 \times 10^6$  células en 100 µl de SF) se administraron por vía traqueal a los 2 y 14 días después de la BLM. Los animales fueron sacrificados a los 28 días. Se utilizó el índice de Ashcroft para determinar el grado de FP. Se determinó la expresión de Hsp27, Vegf, Nfkb, IL6, IL1, Col4 y Tgfβ1 mediante RT-PCR.

**Resultados:** No hubo ningún caso de mortalidad. En el examen macroscópico, Control y Sham mostraron una apariencia pulmonar normal. Se observaron más áreas de FP bilateralmente en el grupo BLM en comparación con BLM+ADSC-2d y BLM+ADSC-14d. La Escala de Ashcroft fue: Control=0; Sham=0,37±0,07; BLM=6,55±0,34 (p=0,006). En comparación con el grupo BLM; BLM+ADSC-2d=4,63±0,38 (p=0,005) y BLM+ADSC-14d=3,77±0,46 (p=0,005). BLM vs Sham incrementó significativamente la expresión de Hsp27 (p=0,018), Nfkb (p=0,009), IL1 (p=0,006), Col4 (p=0,004), Tgfβ1 (p=0,006) y no hubo cambios significativos en Vegf (p=0,855). BLM+ADSC-2d disminuyó significativamente la expresión de Hsp27 (p=0,009) e incrementó Vegf (p=0,006) y Nfkb (p=0,009) y no hubo cambios significativos en IL6 (p=0,175), Col4 (p=0,465), IL1 (p=0,465) y Tgfβ1 (p=0,1). BLM+ADSC-14d disminuyó significativamente Hsp27 (p=0,028), IL6 (p=0,013) y Col4 (p=0,002), e incrementó Nfkb (p=0,040) y Tgfβ1 (p=0,002) sin que se observaran diferencias en Vegf (p=0,770) e IL1 (p=0,053).

**Conclusiones:** El trasplante traqueal de ADSC, no utilizado previamente, ha disminuido de forma significativa el grado de FP cuando el trasplante se ha realizado en fases precoces de la enfermedad (2 días) o en fases de enfermedad instaurada (14 días). La administración traqueal permitió la utilización de dosis más bajas de ADSC que la vía intravenosa. La expresión de Hsp27, Vegf, Nfkb, IL6, Col4, Tgfβ1 podría ser útil para monitorizar la respuesta al trasplante de ADSC en FP. Desde el punto de vista traslacional el trasplante de ADSC por vía traqueal podría ser una nueva opción de tratamiento de los pacientes con FP.





## ABSTRACT

**Introduction:** Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) is a progressive interstitial lung disease with poor prognosis. Adipose stem cells (ADSC) have demonstrated regenerative properties in several tissues. The hypothesis of this study was that airway transplantation of ADSC could protect against BLM-induced Pulmonary Fibrosis (PF).

**Method:** Fifty-eight lungs from 29 male Sprague-Dawley rats were analyzed. Animals were randomly divided into 5 groups: a) control (n=3); b) sham (n=6); c) bleomycin (BLM) (n=6); d) BLM+ADSC-2d (n=6); and e) BLM+ADSC-14d (n=8). Animals received 500µl saline (sham), 2,5UI/kg BLM in 500µl saline (BLM) and  $2 \times 10^6$  ADSC in 100µl saline intra-tracheally at 2 (BLM+ADSC-2d) and 14 days (BLM+ADSC-14d) after BLM. Animals were sacrificed at 28 days. Blinded Ashcroft score was used to determine pulmonary fibrosis extent on histology. Hsp27, Vegf, Nfkβ, IL1, IL6, Col4, and Tgfβ1 mRNA gene expression were determined using qRT-PCR.

**Results:** Ashcroft index was: control=0; sham= $0.37 \pm 0.07$ ; BLM= $6.55 \pm 0.34$  vs sham ( $p=0.006$ ). BLM vs BLM+ADSC-2d= $4.63 \pm 0.38$  ( $p=0.005$ ) and BLM+ADSC-14d= $3.77 \pm 0.46$  ( $p=0.005$ ). BLM vs Sham significantly increased Hsp27 ( $p=0.018$ ), Nfkβ ( $p=0.009$ ), Col4 ( $p=0.004$ ), Tgfβ1 ( $p=0.006$ ) and decreased IL1 ( $p=0.006$ ). BLM+ADSC-2d vs BLM significantly decreased Hsp27 ( $p=0.009$ ) and increased Vegf ( $p=0.006$ ), Nfkβ ( $p=0.009$ ). BLM+ADSC-14d vs BLM significantly decreased Hsp27 ( $p=0.028$ ), IL6 ( $p=0.013$ ), Col4 ( $p=0.002$ ), and increased Nfkβ ( $p=0.040$ ) and Tgfβ1 ( $p=0.002$ ).

**Conclusions:** Airway transplantation of ADSC significantly decreased the fibrosis rate in both early and established pulmonary fibrosis, modulating the expression of Hsp27, Vegfa, Nfkβ, IL6, Col4, and Tgfβ1. From a translational perspective, this technique could become a new adjuvant treatment for patients with IPF.



---

---

# I INTRODUCCIÓN



## 1.1 FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

La Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI) es la enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID) más frecuente.

Los criterios diagnósticos y las recomendaciones para evaluar la evolución y tratamiento de la FPI se establecieron por primera vez en el consenso de la American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (ERS) publicado en el año 2000<sup>1</sup>.

## 1.2 DEFINICIÓN

La FPI se define como una neumonía intersticial fibrosante crónica, limitada al pulmón, progresiva y fatal, de causa desconocida, que afecta generalmente a adultos mayores de 50 años, y asociada al patrón radiológico y/o histológico de la Neumonía Intersticial Usual (NIU)<sup>2</sup>, caracterizada por la pérdida irreversible de función pulmonar.

## 1.3 INCIDENCIA Y PREVALENCIA

La FPI es una enfermedad crónica, de curso progresivo y de etiología desconocida, con una tasa de incidencia y prevalencia no bien conocidas hasta ahora.

La epidemiología de la FPI ha cambiado en las últimas década y recientes estudios indican que la incidencia y prevalencia de la FPI se ha incrementado en los últimos años probablemente debido a la optimización de los métodos diagnósticos y al aumento de la esperanza de vida<sup>3-4</sup>.

Afecta con mayor frecuencia a varones adultos, asociándose con un patrón radiológico / histológico de Neumonía Intersticial Usual.

En EEUU hay aproximadamente 89.000 pacientes con FPI y 14.000 – 34.000 nuevos pacientes cada año<sup>4</sup>. La prevalencia de FPI en EEUU osciló entre 14–27,9 casos/100.000/habitantes y 42,7–63/100.000 habitantes según los criterios utilizados para la definición de caso clínico con FPI<sup>5</sup>.

Los resultados observados en Europa han sido más bajos entre 1,25–23,4/100.000 habitantes. En el Reino Unido hay 15.000 pacientes aproximadamente con FPI, con 5.000 nuevos casos cada año.

Respecto a los resultados de la incidencia en FPI se estimó entre 6,8–8,8/100.000 habitantes y 16,3–17,4/100,000 habitantes.

En Europa la incidencia anual es más baja y se sitúa entre 0,22-7,4 /100.000 habitantes. Se han apreciado diferencias entre las tasas de prevalencia e incidencia de FPI, siendo más elevadas en EEUU respecto a Europa<sup>5</sup>. Los estudios ajustados a la edad y sexo confirman un incremento de la FPI en varones en los últimos años<sup>5</sup>.

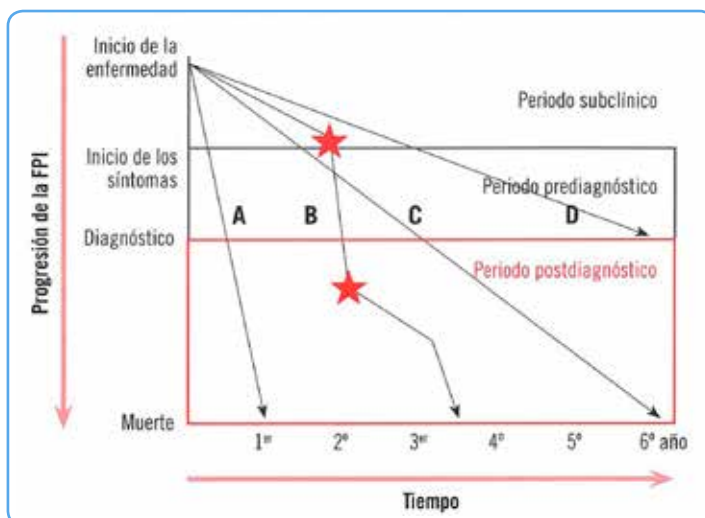
Se han realizado varios estudios para evaluar la incidencia y prevalencia de la FPI. Entre las neumopatías intersticiales idiopáticas es la más frecuente (50%-60%) y los datos más fiables estiman que la incidencia varía entre 4,6-7,4 /100.000 nacimientos y la prevalencia se sitúa entre 13/100.000 habitantes en mujeres y 20/100.000 habitantes en varones<sup>5</sup>.

De acuerdo con estos datos, se estima que en España la FPI puede estar afectando aproximadamente a unas 7.500 personas<sup>4</sup>. La prevalencia de FPI se ha incrementado en las últimas décadas, representando el 17 – 37% de las EPID<sup>5</sup>.

A fecha de hoy se desconoce si la incidencia y la prevalencia se ven influenciadas por factores étnicos, raciales, geográficos o culturales.

## 1.4 HISTORIA NATURAL

La historia natural de la FPI es variable, pudiendo presentar una evolución estable, un lento y progresivo deterioro, o una rápida progresión de la enfermedad, así como presentar episodios agudos en pacientes con una evolución estable o lentamente progresiva, lo que sugiere la posible existencia de distintos fenotipos, pudiendo los mismos, tener importantes implicaciones pronósticas, terapéuticas y en la realización de ensayos clínicos.



**Fig. 1** Representación del curso clínico de la FPI  
Eur. Respir. Rev. 2013; 22:128, 148 -152

Algunos pacientes pueden permanecer asintomáticos durante 2-3 años. No obstante, la mayoría presentan una lenta progresión con deterioro clínico y de la función pulmonar que ocasiona insuficiencia respiratoria crónica (Fig. 1) (Tabla 1).

**Tabla 1. Disminución de la Capacidad Vital Forzada y supervivencia**

Variable	Valor	Visitas (n)	Muertes (n)	Muertes (%)	HR (IC 95%)	p-valor
Cambio en el % CVF a las 24 semanas	< -10	166	40	24.1	7.26 (4.34-12.14)	<0.001
	-5 a -9.9	373	45	12.1	3.43 (2.08-5.68)	<0.001
	0 a -4.9	678	34	5.0	1.38 (0.81-2.34)	0.237
	>0	639	23	3.6		

(du Boris RM, Albera C, Bradford W, et al. Am J Respir Crit Care Med 2009; 179:A1114)

En otros casos, existen períodos de relativa estabilidad con episodios de agudización (exacerbaciones agudas u otras complicaciones) que son causa de alta morbilidad y mortalidad<sup>2</sup>.

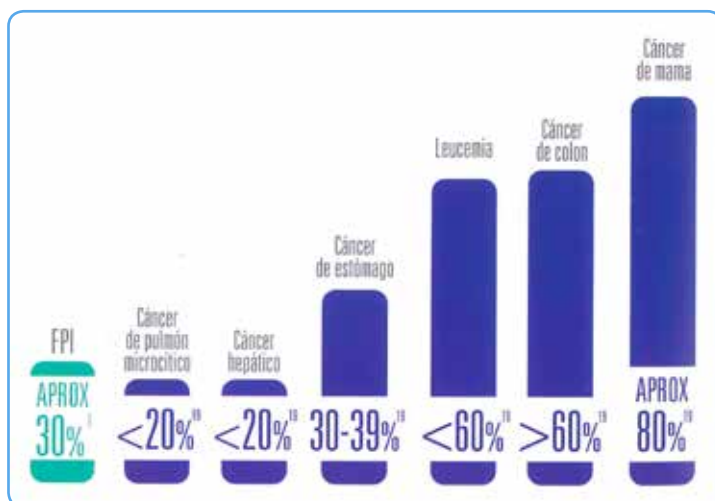
En una minoría de pacientes, la enfermedad es de corta duración con una progresión más rápida (forma acelerada)<sup>6</sup>.

En general la supervivencia media es de 2,5 - 5 años desde el inicio de los síntomas<sup>2</sup>.

Haciendo una comparativa en la tasa de supervivencia a 5 años para la FPI y las neoplasias más comunes, observamos que sólo están por delante los casos de Cáncer de Pulmón y el Cáncer de Páncreas (Fig.2).

A pesar de los recientes avances en el conocimiento de la fisiopatología y de la historia natural de la FPI, la fase inicial de la enfermedad es todavía una gran desconocida dado que la mayoría de los pacientes se diagnostican en fase leve o moderada cuando ya presentan síntomas y alteración ventilatoria restrictiva en las pruebas de función pulmonar.





**Fig. 2.** Comparación de la tasa de supervivencia a 5 años y las neoplasias más comunes

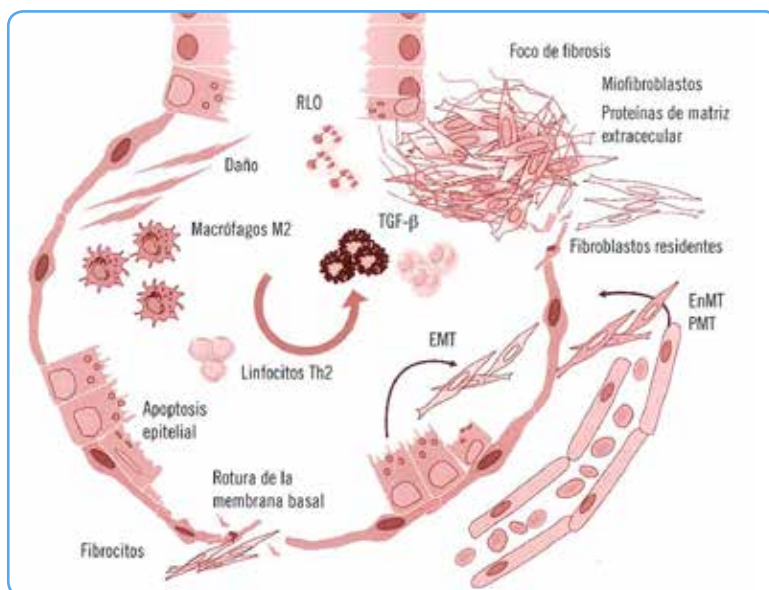
(Allemani C, et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*.2015 Mar 14; 385(9972): 977-1010. doi:10.1016/S0140-6736(14)62038-9.)

## 1.5 ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

El proceso fisiopatológico común de las Enfermedades Pulmonares Intersticiales Difusas (EPID) es el acúmulo de fibroblastos y miofibroblastos activados. Los fibroblastos son los responsables de la producción y del *turn-over* de la matriz extracelular.

La etiología de la FPI no se conoce, aunque probablemente es debida al efecto de diversos factores en sujetos con predisposición genética<sup>7</sup>

Aunque el origen de la lesión en las fases iniciales de la enfermedad es desconocido, habitualmente se ha considerado que la formación de la fibrosis en el parénquima pulmonar estaba provocada por una inflamación crónica. Sin embargo, el hecho que el tratamiento con terapias antiinflamatorias no ha sido eficaz en el tratamiento de la FPI ha cuestionado el papel que representa la inflamación como causa del desarrollo de la enfermedad. Hoy en día se piensa que la desestructuración del tejido pulmonar y la formación de la fibrosis son resultado de una reparación anómala de las lesiones, dando lugar a una acumulación progresiva de proteínas de la matriz extracelular (MEC), a una disminución entre el equilibrio fibroblastos-miofibroblastos y a la muerte continuada de células epiteliales. Por lo tanto, actualmente se considera que las células epiteliales, los fibroblastos y los miofibroblastos son los principales causantes en la progresión de la enfermedad.



**Fig. 3** Representación de los procesos celulares que tienen lugar durante el proceso de fibrosis en un alveolo pulmonar

### Células Alveolares

La superficie alveolar se encuentra recubierta por dos tipos de células epiteliales llamadas células alveolares tipo I (AT I) y tipo II (AT II), siendo las tipo II más numerosas que las tipo I. En pacientes con FPI se ha observado un incremento de la apoptosis de las AT II tanto en el epitelio hiperplásico cubierto de fibroblastos, como en regiones del pulmón prácticamente normales.

La apoptosis celular programada se produce en respuesta inflamatoria. La apoptosis es una de las características principales de la FPI mediante tres procesos diferentes (Fig. 3):

- Incremento de la apoptosis en las células epiteliales, lo que impedirá una correcta reepitelización
- Resistencia de la apoptosis en los fibroblastos y miofibroblastos que dará lugar a un incremento de las lesiones fibróticas
- Insuficiente eliminación de las células apoptóticas, lo que favorecerá un proceso inflamatorio.

En patología pulmonar los fibrocitos se han relacionado con la patogénesis del asma crónico, la fibrosis pulmonar idiopática y la bronquiolitis en el post-trasplante de médula ósea.

Su paso desde la médula ósea a sangre periférica y al pulmón está regulado por citoquinas (CxCL12 y CCL2), que aumentan en estos procesos, como se ha demostrado en modelos animales de fibrosis pulmonar.

- **Factores genéticos.** Las alteraciones genéticas con más relevancia clínica son: mutaciones en los genes que mantienen la longitud de los telómeros (TERT, TERC), en el gen que codifica la proteína C-del surfactante y en la región promotora del gen de la mucina 5B (MUC5B). No existe en la actualidad posibilidad de diagnóstico genético que valore la predisposición a la FPI<sup>7</sup>.
- **Factores ambientales.** Son considerados factores de riesgo el tabaquismo (>20 paquetes/año) y la exposición al latón, acero, plomo y polvo de madera.
- **Reflujo gastroesofágico.** Varios estudios han demostrado que el reflujo gastroesofágico es un factor de riesgo para la predisposición y progresión de la FPI<sup>8</sup>.
- **Infecciones víricas.** No existe evidencia suficiente para considerar que las infecciones víricas (virus hepatitis C, herpes virus, citomegalovirus) sean factores etiológicos de la FPI, aunque la contribución de los mismos sigue siendo objeto de estudio.
- **Autoinmunidad.** El posible origen autoinmune de la FPI se basa en que las manifestaciones radiológicas y/o histológicas de la NIU se asocian a enfermedades del tejido conectivo.

## 1.6 DIAGNÓSTICO

En los últimos años se han producido importantes avances en el conocimiento de sus bases fisiopatológicas, y de ello se ha derivado un cambio en el paradigma del tratamiento de la FPI. Las enfermedades pulmonares infiltrativas difusas, tanto agudas como crónicas, forman un grupo heterogéneo de procesos caracterizados en su mayoría por la aparición de una reacción inflamatoria a nivel de la pared alveolar, desencadenada por diferentes antígenos que alcanzan el epitelio alveolar tras su inhalación o a través de circulación sanguínea. A pesar de que los agentes etiológicos pueden ser muy variados (como he comentado en el apartado anterior), y en ocasiones desconocidos, la respuesta pulmonar suele ser muy estereotipada. A partir de esa reacción inflamatoria inicial en la pared alveolar, el proceso se extenderá hacia el interior de los alveolos e intersticio.

Desde un punto de vista conceptual, el término “*enfermedad pulmonar infiltrativa difusa*”, por ser menos restrictivo, se ajusta mejor a la realidad histopatológica que el término “*enfermedad pulmonar intersticial difusa*”. Aunque las lesiones se localicen preferente-

mente a nivel intersticial, la mayoría de las enfermedades pulmonares infiltrativas difusas son mixtas y se acompañan de un componente inflamatorio tanto a nivel alveolar como intersticial y en ocasiones también bronquiolar.

En la actualidad el diagnóstico de la FPI es un proceso dinámico y multidisciplinar, ya que el diagnóstico final debe establecerse a través de la colaboración de neumólogos, radiólogos y patólogos y sólo una vez se hayan revisado todos los datos clínicos, radiológicos y patológicos del paciente.

Diagnosticar precozmente la enfermedad tiene una importancia crucial cuando tenemos tratamientos eficaces que ofrecen “*una ventana de oportunidad*” durante el cual podemos obtener unos resultados óptimos, y que sobrepasada ese momento del curso de la enfermedad pueden no tener indicaciones por ser ineficaz. Este diagnóstico precoz es difícil, ya que en su evolución la FPI transcurre por un amplio período de tiempo en el que no hay síntomas y posteriormente un período, si bien hay síntomas, estos son inespecíficos<sup>9</sup>.

Un diagnóstico precoz facilita instaurar un tratamiento en fase inicial y puede contribuir a mejorar el pronóstico y la supervivencia del paciente<sup>10</sup>.

Actualmente disponemos de medidas que pueden facilitar el diagnóstico en fases tempranas:

- a) La exploración física buscando la presencia de crepitantes tipo velcro, promoviendo una educación activa entre los profesionales médicos que tiene contacto con los pacientes en fases iniciales (atención primaria)
- b) Promover el screening entre la población de riesgo: mayores de cincuenta años, fumadores, con tos persistente, acropaquias, disnea de esfuerzo y con crepitantes tipo velcro en la auscultación.

Las pruebas de función pulmonar en fases precoces pueden ser normales o mostrar sólo una limitación en la difusión.

El diagnóstico definitivo de FPI requiere:

- a) La exclusión de otras entidades clínicas definidas o enfermedades parenquimatosas pulmonares difusas de causa conocida (exposición ambiental doméstica y laboral, enfermedades del tejido conectivo o exposición a toxicidad por fármacos)
- b) La presencia de un patrón histológico de NIU en el examen del tejido obtenido por biopsia pulmonar quirúrgica, la evidencia radiológica de patrón NIU en la TACAR, o ambas.

Una valoración multidisciplinar en la que participen neumólogos, radiólogos y patólogos expertos en el diagnóstico y manejo de las EPID consigue aumentar la precisión diagnóstica, siendo en el momento actual una recomendación ampliamente aceptada para establecer el diagnóstico<sup>2-9</sup>.

Incluso, se propone la inclusión también de los reumatólogos con el fin de ofrecer un mejor diagnóstico y atención, dado que hay distintas enfermedades pulmonares intersticiales difusas y son muy similares a las FPI, para descartar que sea una enfermedad del tejido conectivo y no una FPI, ya que las enfermedades del tejido conectivo tienen un tratamiento distinto con un mejor pronóstico.

### **1.6.1 Características clínicas y pruebas complementarias**

El cuadro clínico de la FPI es de comienzo insidioso y se suele caracterizar por disnea de esfuerzo progresiva en muchas ocasiones acompañada de tos improductiva. El inicio de los síntomas es lento, pero van empeorando con el tiempo. La demora entre el inicio de la sintomatología y el diagnóstico final es variable y puede estar entre los 6 meses y los dos años<sup>10</sup>.

La presencia de síntomas/signos sistémicos debe hacer sospechar un diagnóstico alternativo. Se auscultan estertores crepitantes en el 90% de los pacientes y se objetivan acropaquias en el 50%.

No hay alteraciones de laboratorio específicas para esta enfermedad. Aún en ausencia de signos o síntomas específicos de enfermedades del tejido conectivo se deben realizar determinaciones serológicas en todos los pacientes<sup>2</sup>.

Se puede detectar positividad en los anticuerpos antinucleares o factor reumatoide hasta en un 20% de los casos de FPI. Por otra parte, en los últimos años ha cobrado interés la posibilidad de emplear nuevos biomarcadores en el diagnóstico y caracterización de esta enfermedad. Algunos, como KL-6, SP-A y SP-D, fibrocitos circulantes y metaloproteinasas 1 y 7, están bajo investigación en el momento actual<sup>11-14</sup>.

### **1.6.2 Lavado broncoalveolar y biopsia transbronquial**

El lavado broncoalveolar (LBA) es un procedimiento fibrobroncoscópico con un importante papel en el diagnóstico de las enfermedades pulmonares intersticiales. El estudio del perfil inflamatorio en el LBA así como el estudio inmunohistoquímico del mismo puede ser una herramienta diagnóstica que permita en algunos casos evitar la realización de técnicas diagnósticas invasivas, tales como una biopsia pulmonar quirúrgica (BPQ). Así mismo, su análisis permite en algunas ocasiones apoyar el diagnóstico clínico, o bien sugerir un diagnóstico alternativo.

Tradicionalmente, se asume que una única muestra de LBA es suficientemente representativa de la enfermedad intersticial pulmonar, asumiendo que ésta afecta a todos los segmentos broncopulmonares.

El lavado broncoalveolar ha sido ampliamente empleado en el estudio de las EPID. Su análisis en la FPI suele mostrar neutrofilia discreta con o sin eosinofilia, y su empleo clásicamente ha estado relacionado con su capacidad para descartar otras entidades.

En el último consenso internacional, se señala que el LBA con análisis celular no debería realizarse de forma sistemática a todos los pacientes en el proceso diagnóstico, pero, sin embargo, podría ser apropiado para una minoría<sup>2</sup>.

No obstante, en casos determinados, el LBA puede ser de gran ayuda en el diagnóstico diferencial con otras entidades como la neumonitis por hipersensibilidad o la neumonía intersticial no específica.

La biopsia transbronquial es útil en aquellas enfermedades con distribución linfática y centrolobulillar o en aquellas que presentan rasgos diagnósticos característicos y que tienen una distribución difusa. Con mayor frecuencia se utiliza para el diagnóstico de sarcoidosis, infecciones y tumores<sup>15</sup>.

En cambio, no tiene utilidad en el diagnóstico de la FPI dado que no es posible observar la distribución de la lesión por el tamaño de la muestra. La incorporación a la práctica de la criobiopsia es muy prometedora, pero se precisan más estudios para corroborar su utilidad en las EPID<sup>16</sup>.

### **1.6.3 Tomografía axial computerizada de alta resolución**

La Tomografía Axial Computerizada (TAC) alcanzó protagonismo en el estudio y diagnóstico de las EPID hacia la mitad de la década de los ochenta. Los avances técnicos permitieron el desarrollo de una nueva técnica de TAC de alta resolución (TACAR), en la que se utiliza un grosor de corte de 1-2mm y la aplicación de un algoritmo de reconstrucción de alta resolución para mostrar los detalles finos del parénquima pulmonar; mediante esta técnica se obtienen imágenes similares a las de anatomía macroscópica pulmonar (lobulillo pulmonar secundario).

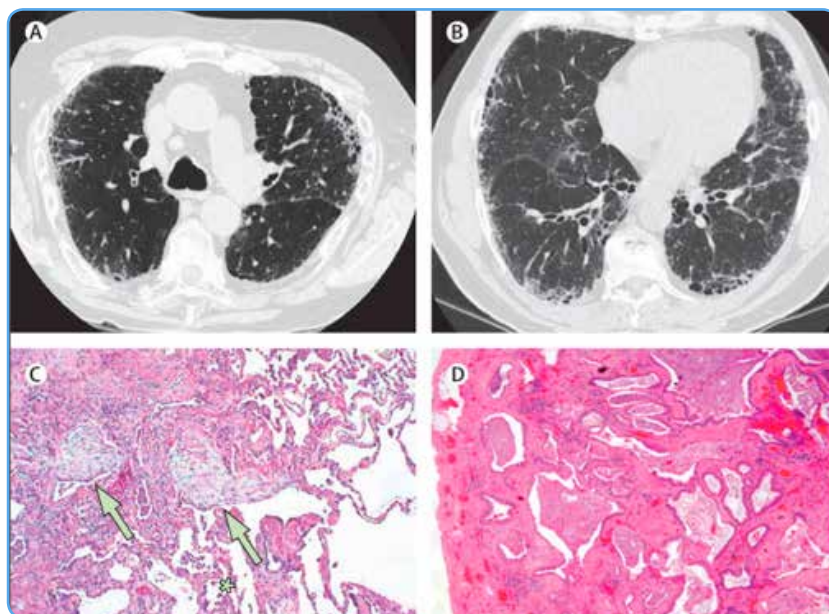
La TACAR permite una mejor resolución espacial a pesar de la aparición de un aumento del ruido visible en las imágenes. Este aumento de ruido no dificulta la interpretación clínica de las imágenes obtenidas excepto en los pacientes muy obesos.

La TACAR representa el mayor avance diagnóstico de las dos últimas décadas y se ha convertido en el método de imagen más sensible para el estudio de las enfermedades pulmonares difusas, ya sea mediante adquisición secuencial (“adquisición corte a corte”) o volumétrica (“adquisición continua”).

Es una técnica ampliamente aceptada para el estudio de un gran número de enfermedades pulmonares parenquimatosas y de la pequeña vía aérea e indiscutible en el diagnóstico de la FPI.

El conocimiento de la dosis de radiación empleada en la TACAR es muy importante; la dosis de radiación empleada en la TACAR volumétrica triplica los valores alcanzados mediante la TACAR secuencial.

La decisión entre utilizar una u otra técnica dependerá del balance entre la información esperada y el riesgo individual por el aumento de la radiación recibida. Se recomienda el seguimiento de los protocolos establecidos, teniendo en cuenta que la edad del paciente es un factor decisivo.



**Fig. 4.** Corte de TACAR a nivel de las bases pulmonares mostrando un patrón reticular de localización subpleural y la presencia de múltiples quistes de pequeño tamaño que representan áreas de panalización asociada (flechas) (Talmadge E King Jr, et al. Lancet 2011; 378:1949-61)

El objetivo es identificar los hallazgos típicos del patrón de NIU (Fig. 4) y distinguirlos de los patrones menos específicos presentes en las otras neumonías intersticiales idiopáticas. Para evitar errores descriptivos y de concepto, la lectura radiológica debe utilizar términos consensuados como los recomendados por la sociedad Fleischner<sup>17</sup>.

El consenso oficial ATS/ERS/JRS/ALAT 2012<sup>2</sup> establece que en la TACAR, el diagnóstico de certeza de la NIU (Tabla 2) se basa en la identificación de los cuatro hallazgos “típicos”:

- La afectación pulmonar debe tener un predominio basal y una localización subpleural.
- Presencia de reticulación evidente.
- Existencia de panalización con/sin bronquiectasias/bronquiolectasias de tracción, demostrar la ausencia de hallazgos considerados excluyentes de un patrón de NIU.

**Tabla 2. TACAR Hallazgos considerados excluyentes de un patrón de NIU\***

Predominio en campos medios o superiores
Predominio peri-broncovascular
Presencia importante de vidrio deslustrado
Numerosos micronódulos (bilaterales, lóbulos superiores)
Quistes (múltiples, bilaterales, distantes de las zonas de panalización)
Patrón de atenuación en mosaico/atrapamiento aéreo (bilateral, en tres o más lóbulos)
Consolidación segmentaria



Destacamos también aquellos hallazgos de la TACAR que son sugestivos de Fibrosis. (Tabla 3)

**Tabla 3. Hallazgos de la TACAR sugestivos de Fibrosis**

Hallazgos específicos	Hallazgos inespecíficos
Panalización Bronquiectasias de tracción Bronquiolectasias de tracción	Reticulación irregular Distorsión de la arquitectura Densidad en “vidrio deslustrado”

La presencia de vidrio deslustrado debe ser mínima o inexistente.

La panalización, formada por grupos de quistes con paredes finas, con una localización subpleural y un diámetro entre 3-10 mm, es un hallazgo imprescindible para diagnosticar con certeza el patrón de NIU (Fig. 5).

Cuando no hay panalización visible, el diagnóstico mediante la TACAR será el de posible patrón de NIU; en estos casos, el diagnóstico definitivo de NIU deberá realizarse mediante biopsia. La biopsia pulmonar puede evitarse únicamente cuando la TACAR muestre un patrón de certeza, típico de NIU.



**Fig. 5.** Pulmón mostrando imagen de “panal de abeja”  
(Leslie KO, Wick MR, eds. Practical Pulmonary Pathology: A diagnostic approach. 2nd Ed. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2005)

El valor predictivo positivo de la TACAR en el diagnóstico de la NIU es del 90 al 100%. La TACAR permite, además, valorar la presencia de comorbilidades asociadas (enfisema, hipertensión pulmonar, cáncer de pulmón) que pueden condicionar el curso clínico de la enfermedad.

#### **1.6.4 Patrón histopatológico**

Si la TACAR no muestra un patrón de certeza típico de NIU, el diagnóstico definitivo deberá realizarse mediante biopsia pulmonar quirúrgica.

Las biopsias se deben obtener en más de un lóbulo y a ser posible hay que evitar el lóbulo medio y la língula, ya que suelen mostrar cambios inespecíficos que no aportan información diagnóstica.

La atelectasia por la extracción se puede minimizar mediante la instilación suave de formol con una aguja o bien agitando el tejido en el recipiente con formol tras la retirada de la sutura.

El patrón histológico de NIU viene definido por el cumplimiento de cuatro criterios:

- 1) Evidencia de fibrosis marcada o distorsión de la arquitectura pulmonar, asociada o no a panalización y con un predominio subpleural y paraseptal.
- 2) Presencia de lesiones parcheadas en las que se combinan áreas fibróticas con zonas de pulmón sano.
- 3) Presencia de focos fibroblásticos en áreas de interfase de fibrosis con parénquima sano.
- 4) Ausencia de hallazgos histopatológicos inconsistentes con NIU.

Entre las características no compatibles con patrón NIU estaría la presencia de membranas hialinas, la presencia de focos con neumonía organizativa, granulomas, marcado infiltrado inflamatorio intersticial alejado de las zonas de panalización, cambios predominantemente centrados en la vía aérea o la presencia de otros hallazgos sugestivos de un diagnóstico alternativo (Tabla 4).

**Tabla 4. Patrón de neumonía intersticial usual. Criterios histopatológicos**

<b>Patrón de NIU (los 4 criterios)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Evidencia de marcada fibrosis/deformación de la arquitectura, +/- panalización con distribución redominantemente subpleural/Para-septal.</li><li>• Afectación parcheada del parénquima pulmonar por Fibrosis.</li><li>• Presencia de focos fibroblásticos.</li><li>• Ausencia de características ilncompatibles con diagnostico de NIU que sugieran un diagnostico alternativo.</li></ul>
<b>Patrón de NIU PROBABLE</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Evidencia demarcada fibrosis/deformacion de la arquitectura, +/- panalización.</li><li>• Ausencia de la afectación parcheada o de los focos fibroblásticos, pero no de ambos.</li><li>• Ausencia de características incompatibles con diagnostico de NIU que sugieran un diagnostico alternativo.</li><li>• Sólo cambios tipo panalización.</li></ul>
<b>Patrón de NIU POSIBLE (los 3 criterios)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Afectación parcheada o difusa del parénquima pulmonar por fibro-sis, con o sin inflamación intersticial.</li><li>• Ausencia de otros criterios de UN (ver columna Patrón NIU).</li><li>• Ausencia de características incompatibles con diagnostico de NIU que sugieran un diagnóstico alternativo.</li></ul>
<b>NO Patrón de NIU (alguno de los 6 criterios)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Membranas hialinas.</li><li>• Neumonía organizativa.</li><li>• Granulomas.</li><li>• Marcado infiltrado celular inflamatorio intersticial, además de la panalización.</li><li>• Cambios centrados predominantes en las vías aéreas.</li><li>• Otras características sugestivas de un diagnostico alternativo.</li></ul>

Un patrón histológico indistinguible de la NIU se puede observar en enfermedades sistémicas (por ejemplo artritis reumatoide y esclerodermia), neumonitis por hipersensibilidad crónica, neumonitis por fármacos, asbestosis y fibrosis familiares, por lo que hay que descartar la presencia de granulomas, cuerpos de asbesto, infecciones específicas u otros agentes exógenos en la biopsia.

Son estas las razones por las que un patrón de NIU no debe ser interpretado directamente como de FPI sin haber descartado previamente todas estas enfermedades. En el momento del diagnóstico, las exploraciones complementarias recomendables son valoración del grado de tos y disnea, TACAR, exploración funcional respiratoria (espirometría forzada, volúmenes pulmonares, DLCO), gasometría arterial, prueba de la marcha de los 6 minutos y ecocardiograma.

En el seguimiento de la evolución, las exploraciones a realizar dependerán del estado del paciente. En los casos con alteraciones leves de la función pulmonar y ausencia de limitación al ejercicio, deben realizarse pruebas funcionales respiratorias (FVC, DLCO), pulsioximetría en reposo y radiografía de tórax, cada 3-6 meses.

No obstante, deben practicarse en periodos más cortos de tiempo si existen signos de progresión de la enfermedad.

La medición de la TLC no es precisa para valorar la progresión de la enfermedad. En presencia de progresión de la enfermedad debe también realizarse gasometría y la prueba de la marcha de los 6 minutos, de forma secuencial, cada 3/6 meses, con el fin de evaluar la oxigenación y la posibilidad de instaurar oxigenoterapia domiciliaria.

No es preciso realizar la TACAR de forma sistemática y secuencial durante el seguimiento. Debe realizarse en casos de progresión de la enfermedad y de sospecha de complicaciones<sup>2</sup>.

Existen varias escalas para valorar la intensidad de la disnea. Las más utilizadas son la MRC (Medical Research Council), escala de Borg, Índice de disnea inicial e Índice disnea de transición<sup>18,19</sup>. El método más útil para valorar la intensidad de la tos es el cuestionario de Leicester<sup>20</sup>.

Existen diversos cuestionarios para valorar la calidad de vida. Los más utilizados son el SF-36, St. George Respiratory Questionnaire y el University of California San Diego Shortness of Breath Questionnaire<sup>21</sup>.

### 1.6.5 Factores pronósticos

La FPI es una enfermedad de curso clínico variable, por lo que es importante identificar factores que puedan ayudar a definir el pronóstico de los pacientes. Diferentes estudios han evaluado factores clínicos, biomarcadores, parámetros radiológicos y fisiológicos (pruebas funcionales respiratorias y capacidad de ejercicio) y presencia de comorbilidades, asociados con mayor riesgo de mortalidad, tanto en el momento del diagnóstico como evolutivamente durante el seguimiento<sup>22</sup>.

Los factores asociados a peor evolución son (Tabla 5):

- Edad superior a 70 años.
- Comorbilidades asociadas: hipertensión pulmonar, enfisema y carcinoma broncogénico.
- Grado de disnea basal y su incremento en el tiempo. La escala de medición de disnea del MRC ha demostrado ser muy útil para determinar la progresión de la enfermedad<sup>23</sup>.
- DLCO menor del 40% (porcentaje del valor predicho) en el momento del día descenso  $\geq 10\%$  de la FVC y  $\geq 15\%$  de la DLCO (porcentaje del valor predicho) en 6-12 meses. El descenso en la FVC es la medida de función pulmonar que mejor predice mortalidad

Un estudio de *Du Bois et al.*<sup>24</sup>, demostró que los pacientes con una disminución  $\geq 10\%$  de la FVC en 24 semanas tienen casi 5 veces más riesgo de fallecer en el año siguiente (HR 4.78; CI 95% 3.12-7.33), y aquellos con un descenso del 5-10% de la FVC tienen más del doble de riesgo de mortalidad (HR 2.14; CI 95% 1.43-3.20). Se estima que la diferencia mínima clínicamente importante (DMCI) en la variación de la FVC es del 2-6%. En el subgrupo de pacientes con FPI y enfisema asociado, en los que los volúmenes pulmonares son normales o poco disminuidos, la variación de la FVC no predice supervivencia.

Tabla 5. Variables predictores de supervivencia

Basales	Seguimiento
Grado de disnea	Aumento del grado de disnea
DLCO ≤40%	Descenso de FVC ≥10%
Saturacion <88% en PM6M	Descenso de DLCO ≥15%
Extensión de la fibrosis en TACAR	Descenso > 50 m en TM6M
Hipertensión pulmonar	Empeoramiento de la fibrosis en TACAR
Biomarcadores	Biomarcadores

1.6.5.1 Desaturación en la prueba de marcha de los 6 minutos

Tanto la desaturación (SpO2 88%) como la distancia recorrida son predictores de mortalidad en FPI<sup>25</sup>. La reducción >50m en la distancia recorrida en 24 semanas se asocia a un aumento de 4 veces el riesgo de muerte en un año (HR 4.27; CI 95% 2.57- 7.10). La DMCI se establece en una distancia de 24-45 metros.

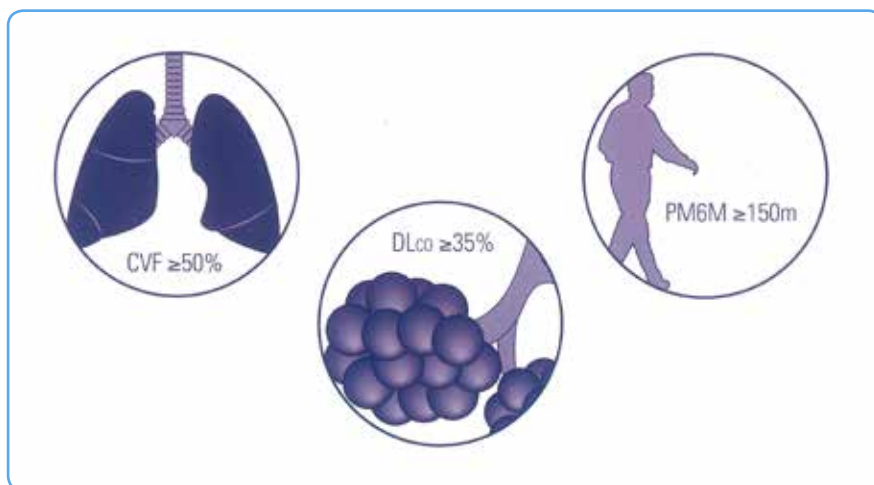
La desaturación discrimina qué parámetro funcional es el más adecuado para el seguimiento. En pacientes con SpO2 ≤88% la disminución >15%de la DLCO en 6 meses es el mejor predictor de mortalidad, mientras que en con SpO2 >88%, el parámetro más significativo es la disminución >10% de la FVC (Fig. 6).

La prueba de la marcha de los 6 minutos tiene una buena correlación con el consumo máximo de oxígeno (VO2max), medido en la prueba de ejercicio cardiopulmonar.

Un valor de VO2max por debajo de 8.3 ml.kg-1.min-1 se asocia a mayor riesgo de mortalidad (Fig. 6).

### 1.6.5.2 Extensión de la fibrosis en la TACAR

Determinada por la cuantía de la reticulación, panalización y bronquiectasias de tracción) y progresión de la misma.



**Fig. 6** Criterios funcionales de la FPI leve a moderada

(Noble PW, Albera C, Bradford WZ, et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): Two randomised trials. *Lancet* 2011;377:1760-1769  
Martinez FJ, Safrin S, Weycker D, et al. The clinical course of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med* 2005;142:963-967)

### 1.6.5.3 Biomarcadores

En los últimos años hay un creciente interés en la búsqueda de biomarcadores que ayuden a los clínicos en el manejo de los pacientes de FPI.

La identificación de estos marcadores es atractiva en esta grave enfermedad por varias razones:

- Facilitar el diagnóstico y si es posible la susceptibilidad genética.
- Monitorizar la actividad de la enfermedad y la eficacia del tratamiento.
- Proporcionar información acerca de la progresión de la enfermedad o el pronóstico<sup>26</sup>.

El desarrollo de FPI se ha asociado con mutaciones en las proteínas C y A1 del surfactante, y en los genes que mantienen la longitud del telómero (TERT, TERC). Recientemente *Seibold et al.*<sup>27</sup>, publicaron un trabajo donde se muestra una asociación significativa entre el polimorfismo en el promotor de la mucina 5B (MUC5B) y la FPI2. El descubrimiento de mutaciones y polimorfismos asociados a la FPI, mejora la capacidad de hacer un screening en los miembros de una familia, aunque se necesitan más estudios para establecer si las diferentes predisposiciones genéticas influyen en distintas manifestaciones clínicas.

En el momento actual los biomarcadores no se encuentran suficientemente validados para incorporarlos de manera rutinaria en el estudio de los pacientes FPI. Los más desarrollados son los pronósticos, que informan de la evolución de la enfermedad, mientras que los diagnósticos, que permiten diferenciar una enfermedad de otra y establecer diferentes clasificaciones de la misma, ofrecen más dudas sobre todo para distinguir pacientes con FPI de aquellos con otras enfermedades intersticiales pulmonares o fumadores sanos.

Si consideramos los mecanismos patogénicos de la FPI existen biomarcadores derivados de los neumocitos tipo II, como las proteínas A y D del surfactante (SP-A, SP-D) y la glicoproteína Krebs von den Lungen-6 (KL-6), derivados de los macrófagos (citoquina CCL18) y sustancias de la matriz extracelular como las metaloproteinasas 1y 7(MMP-1, MMP-7).

El país donde actualmente los biomarcadores en los pacientes con FPI se utilizan más es Japón, donde están disponibles kits comerciales para la determinación de KL-6, SP-A y SP-D.

Respecto al diagnóstico, de los tres la KL-6 tiene la mejor sensibilidad y especificidad para diagnosticar enfermedad pulmonar intersticial (se encuentra elevada en el 70-100% de los pacientes con EPID), y SP-A para diferenciar FPI de otras EPID. Si consideramos su valor pronóstico los niveles elevados en suero de las tres, así como de la MMP-7, se asocian a un peor pronóstico.

Existen dos estudios recientes en los que se combinan parámetros clínicos y biomarcadores para mejorar el valor pronóstico. En el primero de ellos, realizado en Estados Unidos<sup>28</sup>, se desarrolla un índice que incorpora sexo, CVF, DLCO y MMP-7 sérica y que permite diferenciar pacientes con mayor riesgo de mortalidad.

El otro, realizado en Corea del Sur<sup>29</sup>, sugiere que cuando se añaden 3 biomarcadores, en este caso MMP-7, KL-6 y SP-A, a los parámetros clínicos (edad, CVF y DLCO basales y cambio en la CVF en 6 meses) mejora la predicción de mortalidad en pacientes con FPI.



Está en marcha el estudio PROFILE (*Prospective Observation of Fibrosis in the Lung Clinical Endpoints*)<sup>30</sup>, un estudio prospectivo y multicéntrico, uno de cuyos objetivos es validar un panel de biomarcadores en pacientes con FPI.

Aún son necesarios más estudios para clarificar el papel de los biomarcadores en el diagnóstico, evaluación de la progresión y pronóstico de los pacientes con FPI.

## 1.7 TRATAMIENTO

Antes de iniciar el tratamiento en pacientes diagnosticados de FPI debemos valorar siempre el estadio de la enfermedad, factores pronósticos y comorbilidades.

El abanico terapéutico incluye<sup>31</sup>:

- Considerar los tratamientos anti-fibróticos de los que actualmente se dispone.
- Evitar las causas agravantes de la enfermedad (reflujo gastroesofágico, infecciones respiratorias, hipertensión pulmonar).
- Tratar los síntomas, principalmente la tos y la disnea.
- Tener siempre presente el trasplante pulmonar en casos que cumplan criterios.
- Ofrecer terapia paliativa en la fase final de la enfermedad.

### 1.7.1 Tratamiento Farmacológico

En la última década un creciente número de ensayos clínicos multicéntricos aleatorizados, controlados con placebo, han intentado encontrar opciones terapéuticas útiles para la FPI.

A partir de este nuevo concepto y tras diversos avances en el conocimiento patogénico de la fibrosis pulmonar, se abrieron diferentes vías de investigación con el objetivo de inhibir el proceso fibrogénico desencadenado, lo que fue el inicio de la era “anti-fibrótica”.

En los últimos cinco años se han producido notorios avances diagnósticos y terapéuticos en torno a la FPI, destacando varios ensayos clínicos con fármacos antifibróticos, aunque solamente dos han mostrado efectos beneficiosos: la pirfenidona y el nintedanib, siendo los únicos fármacos aprobados por la EMA para el tratamiento de la FPI.

## Pirfenidona (Esbriet®)

La Pirfenidona (5-metil-1-fenil-2-[1H]-piridina), es una nueva y prometedora medicación con efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antifibróticos para el tratamiento de la FPI.

Inhibe la proliferación fibroblástica y la síntesis de proteínas pro-fibrogénicas y citocinas.

Se trata del primer fármaco que se comercializa en España y en la Unión Europea para el tratamiento de la FPI en adultos.

En Febrero de 2011, fue aprobada por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para el tratamiento de la FPI de leve-moderada intensidad, definida por FVC >50% y DLCO >35%.

En España su comercialización se inició el 29 de Septiembre de 2014 para el tratamiento de la FPI de leve a moderada en adultos.

Estos resultados favorables favorecieron su aprobación por la Food and Drug Administration (FDA) el mes de Octubre de 2014.

Diversos estudios experimentales han demostrado el efecto antifibrótico de pirfenidona<sup>32</sup>.

Su mecanismo no está del todo dilucidado, pero se ha demostrado que modula el depósito de matriz extracelular, la producción de citosinas y factores de crecimiento y la proliferación fibroblástica. Un aspecto importante de su mecanismo antifibrótico está asociado con la inhibición de la producción y la actividad del factor de crecimiento  $\beta$  (Tgf $\beta$ 1).

Este fármaco de administración por vía oral, a dosis máximas de 2.403 mg al día presenta un perfil de seguridad aceptable. Las principales contraindicaciones son hipersensibilidad al fármaco, uso concomitante de fluvoxamina, hepatopatía o nefropatía grave y embarazo (no comprobado su uso en esta población). Los efectos secundarios, que suelen ser de intensidad de leve a moderada, más frecuentes son fotosensibilidad (imprescindible protección solar cutánea y ocular), molestias digestivas y alteraciones de la función hepática, en general pueden ser manejados con una reducción temporal de dosis o discontinuación temporal del tratamiento. Durante su uso se debe monitorizar además la función hepática, al ser su metabolismo a este nivel<sup>33-34</sup>.

En este sentido el estudio RECAP es un estudio de extensión, abierto, que estudia la seguridad a largo plazo de la pirfenidona en los pacientes con FPI que completaron el programa

CAPACITY. Dispone de datos de más de 170 pacientes durante un periodo superior a cinco años, llegando, en algunos casos a diez y confirma la tolerancia y la seguridad de la pirfenidona<sup>35</sup>.

El ensayo clínico ASCEND (Assesment of Pirfenidone to confirm Efficacy and Safety in IPF) es el cuarto estudio en fase 3 en que analiza el efecto de pirfenidona frente a placebo. Los resultados del estudio ASCEND confirman los hallazgos de los estudios previos CAPACITY<sup>33</sup> (Clinical Studies Assessing Pirfenidone in IPF: Research of Efficacy and Safety Outcomes) 1 y 2, y el llevado a cabo en Japón por *Taniguchi, et al.*<sup>36</sup>, en el sentido de que pirfenidona disminuye el deterioro en la CVF y de la distancia recorrida en la prueba de la marcha de los 6 minutos.

Hay que resaltar varios aspectos relevantes del estudio ASCEND. En primer lugar, remarcar que se han incluido pacientes con enfermedad más avanzada que en los ensayos CAPACITY, lo cual indica que el fármaco podría ser también eficaz en este grupo de pacientes.

### **Nintedanib**

El Nintedanib es un potente inhibidor intracelular de receptores de tirosincinasas.

Este ejerce su efecto en el factor derivado del crecimiento de plaquetas con acción sobre diversos factores de crecimiento (plaquetario PDGFR, de fibroblastos FGFR y del endotelio vascular VEGFR).

Los estudios IMPULSIS, publicados en mayo de 2014<sup>37</sup>, mostraron que Nintedanib, a dosis de 150mg dos veces al día en los pacientes con FPI, retrasa el deterioro de la función pulmonar, beneficio que se manifiesta por una disminución de la tasa de declinación de la FVC, lo cual es significativo con el enlentecimiento de la progresión de la enfermedad, además de presentar un perfil de seguridad y tolerabilidad aceptables.

Esto llevó a su aprobación por la EMA en Enero de 2015 para el tratamiento de la FPI<sup>37</sup>.

### **N-Acetilcisteína**

La N-Acetilcisteína (NAC) aumenta la síntesis de glutatión, un potente mediador antioxidante, y disminuye la respuesta fibrótica en modelos animales de fibrosis pulmonar.

En el consenso internacional sobre FPI del año 2011, a diferencia del publicado en el año 2000, existe una mayor evidencia científica que permite generar recomendaciones sobre una determinada terapia farmacológica, denominadas “fuertes” o “débiles” ya sean “a favor” o “en contra”.

En este consenso se contraindica “con carácter fuerte” el uso de corticoides en monoterapia, colchicina, ciclosporina A, interferón gamma, bosentán y etanercept, y solamente “con carácter débil” la triple terapia, la NAC en monoterapia, los anticoagulantes y la pirfenidona<sup>38</sup>. Sin embargo, estas recomendaciones necesitarían revisarse y actualizarse, ya que existen nuevos datos procedentes de algunos estudios publicados con posterioridad.

No obstante, la combinación de glucocorticoide, azatioprina y NAC ha sido el tratamiento de elección hasta que se han conocido los resultados del estudio PANTHER<sup>39</sup>.

El estudio PANTHER comparó la eficacia de placebo vs NAC vs glucocorticoides asociados a NAC y azatioprina. Este estudio ha demostrado mayor mortalidad e ingresos hospitalarios en los pacientes que recibían la triple terapia en comparación con el placebo o con el tratamiento con NAC.

Por tanto, no se aconseja utilizar esta triple terapia. En la actualidad, el ensayo continúa con solo dos ramas: NAC y placebo; los resultados se publicaron en mayo de 2014 y no mostraron beneficios de NAC en monoterapia frente a placebo, sumándose así a la lista de estudios con resultados negativos<sup>40</sup>.

### 1.7.2 Tratamiento no farmacológico

Aunque el tratamiento farmacológico es ciertamente fundamental, el manejo de las enfermedades es mucho más complejo. La asistencia integral incluye desde aspectos relacionados con el ejercicio físico, hasta la dieta, pasando por la ayuda psicológica. Una asistencia integral es, hoy en día, sinónimo de calidad asistencial.

Sin embargo, dada la orfandad de la FPI, sólo ciertos aspectos del tratamiento integral, como la rehabilitación respiratoria (RR), han sido estudiados adecuadamente e implantados en la rutina del manejo de estos pacientes.

En este apartado he revisado la evidencia científica existente en la literatura médica respecto a los principales componentes de la asistencia integral.

### 1.7.3 Medidas generales

Al igual que en la mayoría de las enfermedades respiratorias crónicas, en la FPI, cuando no hay otra contraindicación, se debe recomendar a los pacientes la administración de la vacunación antigripal (anual) y antineumocócica.

En los pacientes fumadores activos debe recomendarse el abandono del hábito tabáquico.

La FPI produce una carga sintomática significativa para los pacientes y una importante carga emocional en los pacientes y familiares. El curso progresivo de la enfermedad requiere un plan de seguimiento establecido con el objetivo de mejorar los síntomas y la calidad de vida de los pacientes. Entre los síntomas más debilitantes para los pacientes con FPI se encuentran la disnea, la tos, la fatiga y la depresión y ansiedad. Hay pocos datos disponibles sobre el manejo de los síntomas en la FPI.

A medida que la enfermedad progresa, la disnea es el síntoma más debilitante. La causa principal de la disnea en la FPI es la disminución progresiva de la capacidad pulmonar y la alteración del intercambio gaseoso lo que supone un incremento de la demanda ventilatoria.

Otros factores secundarios también contribuyen a incrementar la disnea como la debilidad muscular, la depresión y la ansiedad. El oxígeno suplementario, la RR, vasodilatadores (sildenafil) y los opioides podrían ser útiles para paliar la disnea en la FPI.

Los accesos de tos repetidos suponen otro síntoma agotador para los pacientes, pudiendo causar dificultad para conciliar el sueño o despertar al paciente durante la noche. La tos suele ser una manifestación primaria de la FPI. También puede ser exacerbada por otras causas de tos crónica como el reflujo gastroesofágico, el asma o la rinitis alérgica. Los ensayos clínicos diseñados para reducir la tos en la FPI son limitados. La talidomida ha demostrado en un ensayo clínico en fase II mejorar la tos. Los fármacos antitusivos como la codeína también pueden ser útiles en casos seleccionados.

Algunos pacientes con FPI experimentan depresión y ansiedad. Suelen deberse a los síntomas debilitantes crónicos, a los efectos secundarios de la medicación y al miedo asociado al mal pronóstico de la FPI. La RR, el apoyo psicosocial y el tratamiento específico cuando sea necesario pueden ayudar a disminuir estos síntomas de la depresión y ansiedad.

La educación y el cuidado personal en la FPI constituyen aspectos muy importantes dentro de las medidas no farmacológicas. La educación en la FPI debería iniciarse una vez realizado el diagnóstico de la enfermedad. Debe incluir aspectos relacionados con la fi-

siopatología de la enfermedad, el pronóstico y la evolución, los tratamientos disponibles y lo que se espera de ellos. Debe hacerse comprender al paciente la importancia de la participación en los ensayos clínicos. El paciente debe conocer a fondo su enfermedad y ser partícipe en la toma de decisiones (tratamiento farmacológico, trasplante pulmonar, cuidados paliativos).

### 1.7.4 Oxigenoterapia crónica domiciliaria

La hipoxemia en reposo y la consiguiente indicación de oxigenoterapia crónica domiciliaria (OCD) en FPI suelen acontecer en los estadios finales de la enfermedad. No existen ensayos clínicos randomizados que evalúen el beneficio de la OCD a largo plazo en FPI, debido a las implicaciones éticas que existen en no proporcionar el tratamiento a los pacientes que presentan insuficiencia respiratoria crónica. Es por esto que las indicaciones de OCD en FPI suelen estar extrapoladas de estudios realizados previamente en otras enfermedades respiratorias crónicas como la EPOC o la insuficiencia respiratoria crónica.

Existen estudios retrospectivos que han evaluado el papel de la oxigenoterapia en reposo, con resultados contradictorios. Algunos confirman que la OCD mejora los parámetros de calidad de vida. Sin embargo, otros, como el realizado por *Douglas et al*<sup>41</sup>, donde analizaron 487 pacientes con FPI de los cuales 133 recibían OCD, no han demostrado una mayor supervivencia en el grupo de tratamiento. Además la OCD puede ser útil en el tratamiento de otras comorbilidades frecuentes en la FPI, como la hipertensión arterial pulmonar (HAP), que están asociadas a un peor pronóstico de la enfermedad y que característicamente cursan con desaturación de oxígeno. Es por ello, que a pesar de no existir una evidencia científica clara, y de los resultados contradictorios de los estudios realizados por el momento, no existe duda en recomendar OCD a todos los pacientes con FPI que presenten una hipoxemia en reposo o nocturna significativa (SatO2 <88%).

Los pacientes con EPID, incluida la FPI, presentan característicamente desaturación de oxígeno durante el esfuerzo, produciendo como consecuencia incremento de la limitación al ejercicio, mayor grado de disnea y disminución de la calidad de vida. Además, esta desaturación de oxígeno al esfuerzo es un factor pronóstico independiente de mortalidad y de progresión de la enfermedad.

Existen varios estudios en FPI que demuestran la asociación entre mortalidad con el deterioro de los parámetros de la PM6M y la necesidad de flujos altos de oxígeno al esfuerzo. *Hook et al.*<sup>42</sup> analizaron 255 pacientes con FPI a los que habían realizado una titulación de oxigenoterapia, definida como el flujo mínimo de oxígeno que se le debe proporcionar a un paciente para mantener una SatO2 mínima del 96% en bipedestación. Demostraron que

existía una relación directamente proporcional entre el flujo de oxígeno proporcionado y la mortalidad, independientemente de otros factores pronósticos como la CVF o los resultados del PM6M. Años más tarde *Lettieri et al.*<sup>43</sup> confirmó estos resultados al analizar retrospectivamente 81 pacientes con FPI estableciendo que aquellos pacientes con mayor desaturación y menor distancia recorrida en el PM6M presentaban una mayor mortalidad.

Varios son los estudios retrospectivos que han evaluado el papel de la oxigenoterapia al esfuerzo en FPI. Han demostrado que aumenta el tiempo de esfuerzo en cicloergómetro, aumenta la distancia recorrida en el PM6M y disminuye la desaturación a la finalización de la prueba junto a la sensación de disnea. El único estudio prospectivo realizado con oxigenoterapia al esfuerzo no demostró diferencias significativas entre el grupo tratamiento y el grupo control (aire ambiente) en cuanto a la escala de disnea. Todos ellos se tratan de estudios con muy pocos pacientes incluidos y con mucha variación en las condiciones de administración de oxigenoterapia que los hace difícilmente comparables. Es por ello que son necesarios estudios prospectivos mejor diseñados que evalúen la indicación de la oxigenoterapia al esfuerzo en la FPI.

En conclusión, es habitual que se les proporcione oxigenoterapia al esfuerzo a aquellos pacientes con FPI que presenten disminución de la SatO<sub>2</sub> <88% durante el PM6M, para mejorar la capacidad de ejercicio, su movilidad y permitir mantener una actividad habitual normal, todo ello relacionado con la mejora de los parámetros de calidad de vida. Además la titulación de la oxigenoterapia mediante la realización de un PM6M nos puede proporcionar una indicación más precisa del flujo de oxígeno necesario en cada paciente.

### 1.7.5 Trasplante pulmonar

El trasplante pulmonar es el único tratamiento para la FPI en estadios evolucionados que ocasiona una importante mejoría funcional e incremento de la supervivencia a 1, 5 y 10 años del 74%, 45% y 22% respectivamente<sup>44</sup>.

Estas tasas son significativamente inferiores que las de trasplantados por otras enfermedades respiratorias como el déficit de alfa-1-antitripsina, hipertensión pulmonar, fibrosis quística o EPOC, pero aunque los resultados del trasplante en pacientes con FPI sean peores, por el momento es la única alternativa terapéutica eficaz, superando todavía los resultados del mejor tratamiento farmacológico disponible.

Por ello, los pacientes con FPI deben evaluarse en una unidad de trasplante pulmonar independientemente del tipo de tratamiento médico que reciban, siempre que no existan contraindicaciones para tal procedimiento quirúrgico (recomendación consistente, calidad de evidencia baja)<sup>44</sup>.

En el estudio de *Arango et al.*<sup>45</sup>, demuestra que la alta mortalidad temprana después de un trasplante de pulmón para la FPI todavía no está bien controlada, y algunos aspectos todavía permanecen en debate. Se revisaron 427 pacientes trasplantados desde octubre 1993 a diciembre 2014 y concluyeron que a pesar del aumento de la edad de los receptores de trasplante, se observó una disminución de la mortalidad a casi la mitad en comparación con los resultados iniciales, el riesgo de mortalidad en pacientes < 55 años de edad es independiente del tipo de trasplante (simple o doble), siendo mayor con un solo trasplante.

### 1.7.6 Rehabilitación Respiratoria

La Rehabilitación Respiratoria (RR) ayuda a aliviar los síntomas y mejorar su calidad de vida. Existen múltiples definiciones de rehabilitación respiratoria (RR), pero una de las más completas y actuales es la aportada por la American Thoracic Society y la European Respiratory Society (ATS/ERS)<sup>46</sup>:

*«La RR es una intervención multidisciplinaria y global que ha demostrado ser eficaz desde la perspectiva de la medicina basada en la evidencia para los pacientes con enfermedades respiratorias crónicas, que a menudo han disminuido las actividades de la vida diaria. La RR debe formar parte de un tratamiento individualizado del paciente, dirigido a reducir los síntomas, optimizar la capacidad funcional, incrementar la participación y reducir los costes sanitarios a través de la estabilización o reversión de las manifestaciones sistémicas de la enfermedad». Los programas de RR (PRR) deben contemplar la evaluación del paciente, el entrenamiento al ejercicio, la educación, la intervención nutricional y el apoyo psicosocial».*

La RR está indicada en todas las enfermedades respiratorias crónicas con síntomas permanentes y limitación de la capacidad física a pesar de un adecuado tratamiento médico. Por un lado, enfermedades obstructivas pulmonares (como EPOC, asma, bronquiectasias, fibrosis quística y bronquiolitis obliterante) y, por otro lado, enfermedades restrictivas (como fibrosis intersticial, sarcoidosis, alteraciones de la caja torácica y enfermedades neuromusculares).

En la actualidad no hay guías de evidencia clínica de la importancia de la RR en los pacientes no-EPOC. La mayoría de los estudios sobre los beneficios de la RR se centran en la EPOC, existiendo pocos estudios en otras enfermedades (asma, fibrosis pulmonar, etc).

En pacientes con enfermedad pulmonar intersticial, especialmente en fibrosis pulmonar idiopática, se observa una correlación entre la debilidad de músculos periféricos y la tolerancia al ejercicio, pudiendo ésta mejorar con entrenamiento (Evidencia C).



Muchas veces asumimos que si se consigue mejorar a un paciente con EPOC, también podríamos hacerlo con otra enfermedad respiratoria. La mejoría es independiente de la edad, el sexo, la función pulmonar o el tabaquismo. La debilidad muscular periférica es un factor predictivo positivo.

Son numerosos los trabajos científicos que avalan la eficacia de la RR, pero no todos sus componentes producen los mismos beneficios. Así, el entrenamiento muscular de las extremidades inferiores es el principal determinante del éxito de los programas de RR que, con un grado de evidencia A, consigue mejorar la disnea, la capacidad de esfuerzo y la calidad de vida relacionada con la salud (CVRS).

La guía ATS/ERS<sup>46</sup> indica que debe utilizarse el entrenamiento tanto de las extremidades superiores como de las extremidades inferiores, combinando el entrenamiento de fuerza con el de resistencia y utilizando con preferencia la técnica de entrenamiento a intervalos. El entrenamiento muscular, la educación y la fisioterapia respiratoria se consideran los componentes fundamentales de los programas de RR, siendo aconsejable también contemplar la terapia ocupacional, el soporte psicosocial y la intervención nutricional.

La duración de los programas de RR en la mayoría de los estudios de enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID) y de FPI, oscila entre 6 y 12 semanas y suele realizarse en régimen ambulatorio en el hospital. El entrenamiento muscular que incluye ejercicios de fuerza y de resistencia constituye la base de los programas de RR realizados en FPI. El entrenamiento de la resistencia mediante ejercicio aeróbico suele realizarse con cicloergómetros estáticos o caminando en tapiz rodante o sobre suelo.

Suelen recomendarse 3 sesiones a la semana de unos 30 minutos de duración aunque no existe un protocolo específico sobre la duración y el tipo de ejercicio, el número de repeticiones en ejercicios de fuerza, etc. No se han documentado efectos adversos relacionados con el ejercicio físico en los estudios realizados en pacientes con FPI.

En cuanto a la reeducación respiratoria, en la FPI se debería enfatizar en la enseñanza de técnicas de control de la respiración y del esfuerzo diafragmático con el objetivo de prevenir la taquipnea, la ansiedad y mejorar el intercambio gaseoso. Dado que muchos pacientes con FPI desarrollan rigidez de las estructuras de la caja torácica, los ejercicios de expansión y de estiramiento de la musculatura torácica podrían ser beneficiosos.

La respiración con los labios fruncidos, propia de la RR en la EPOC, podría ser útil, realizándola de forma suave, para disminuir la frecuencia respiratoria, sobre todo durante el ejercicio.

La medición de la mejora en la distancia recorrida en la prueba de la marcha de los 6 minutos (PM6M) tras un programa de RR constituye uno de los objetivos principales para medir la capacidad de ejercicio en los estudios realizados en FPI. Se estima que la diferencia clínica mínima importante en la PM6M es de 28 metros en los pacientes con FPI.

La mayoría de los estudios demuestran una mejoría en la distancia recorrida tras un programa de RR. *Nishiyama O. et al.*<sup>47</sup>, realizaron un ensayo clínico controlado en el que incluyeron 28 pacientes con FPI (Capacidad vital forzada (CVF) media del 69% del valor predicho). 13 pacientes realizaron un programa de RR durante 10 semanas y 15 pacientes no llevaron a cabo ninguna intervención.

Se observó una mejoría significativa sólo en el grupo de RR mientras que el grupo control permaneció sin cambios (diferencia media de cambio entre grupos de 46.3 metros respecto al valor basal).

*Huppmann et al.*<sup>48</sup> llevaron a cabo un programa de RR de 4 semanas en 402 pacientes con EPID, de los cuales 202 tenían FPI, con una VC media de 53%. En los pacientes con FPI se observó una mejoría media de 45 metros en la PM6M. En este estudio los pacientes que corrían menos distancia en la PM6M antes de realizar la RR, fueron los que mejoraban más.

Se han usado diferentes cuestionarios para medir la calidad de vida y la disnea tras un programa de RR, entre ellos el SF-36, el cuestionario respiratorio de Saint George (SGRQ), el cuestionario de la enfermedad respiratoria crónica (CRQ) y el índice transicional de disnea de Mahler (TDI).

Dos ensayos controlados aleatorizados encontraron mejoras a corto plazo respecto a la capacidad funcional al ejercicio, la disnea y la calidad de vida después de la rehabilitación respiratoria:

El estudio de *Nishiyama O et al.*<sup>47</sup> evaluó la CVRS mediante el SGRQ observándose una mejoría de 6.1 puntos en el grupo de la RR. Se estima una diferencia mínima importante de 5-8 puntos en el SGRQ en los pacientes con FPI. El estudio de *Holland et al.*<sup>49</sup>, obtuvo una mejoría significativa de la disnea medida por el CRQ de 2.7 puntos. El 59% de los pacientes con FPI presentaron mejorías en la disnea por encima de la diferencia mínima importante que se estima en 2.5 puntos en la FPI. El estudio de *Kozu et al.*<sup>50</sup>, sólo observó una mejoría significativa en el TDI de 1.7 puntos en los pacientes con FPI con disnea grado 2 de la escala MRC (Medical Research Council).

Algunos estudios recientes como el de *Vainshelboim B et al.*<sup>51</sup> sugieren efectos beneficiosos de la RR a más largo plazo en la FPI.

La revisión de la Cochrane de RR en la EPID del año 2014<sup>52</sup> concluye que la RR mejora la distancia recorrida en la PM6M con una diferencia media ponderada de 44.34 metros en la EPID y de 35.63 metros en la FPI. Además la RR proporciona una mejoría en la CVRS y una disminución de la disnea en los pacientes con EPID y en el subgrupo de pacientes con FPI. La calidad de la evidencia es baja-moderada debido al diseño de los estudios (muchos de ellos no controlados) y al reducido tamaño muestral.

La evidencia disponible sugiere que la RR puede ser un tratamiento efectivo y seguro en la FPI. Aunque con un nivel de recomendación débil, sería aconsejable incluir a los pacientes con FPI en un programa de RR antes de que la enfermedad alcance estadios evolucionados. En general se recomienda un entrenamiento aeróbico de baja intensidad y limitado por los síntomas. Quedan aún cuestiones por resolver: cuándo iniciar el programa de RR, cuál debe ser la duración óptima y la intensidad de un programa de RR, establecer un protocolo específico de RR en la FPI, cuales son los efectos de la RR a largo plazo.

### 1.7.7 Terapia celular

Las células madre son células con el potencial de convertirse en muchos tipos distintos de células en el organismo. Funcionan como un sistema reparador del cuerpo.

Existen cuatro tipos principales de células madre:

Las *células madre totipotentes* pueden crecer y formar un organismo completo, tanto los componentes embrionarios (como por ejemplo, las tres capas embrionarias, el linaje germinal y los tejidos que darán lugar al saco vitelino), como los extraembrionarios (como la placenta). Es decir, pueden formar todos los tipos celulares.

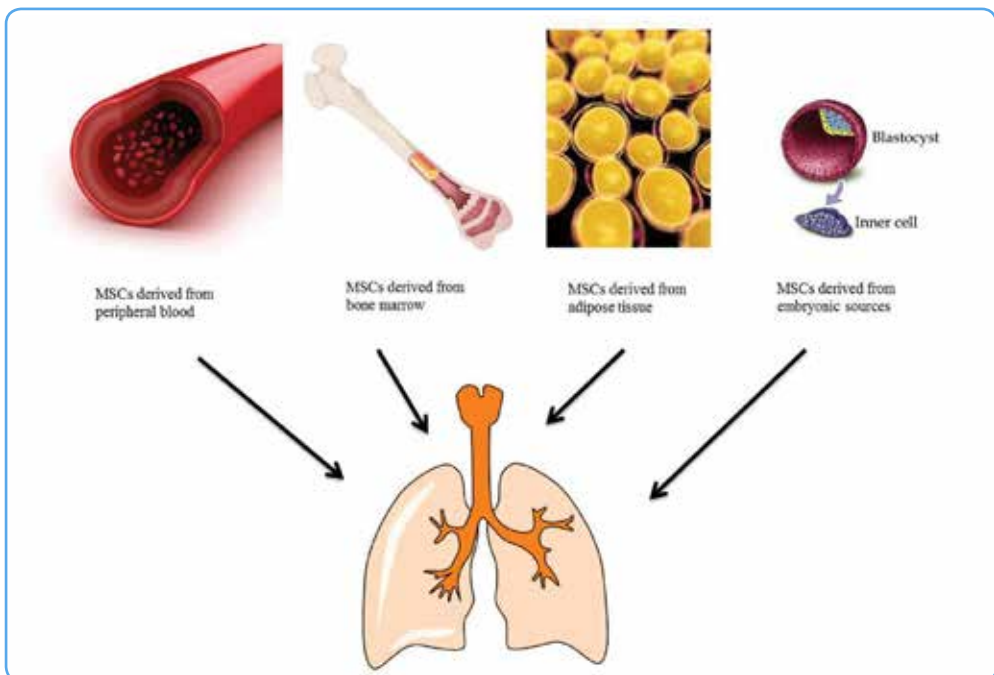
Las *células madre pluripotentes* no pueden formar un organismo completo, pero sí cualquier otro tipo de célula correspondiente a los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo), así como el germinal y el saco vitelino. Pueden, por tanto, formar linajes celulares. Se encuentran en distintas etapas del desarrollo embrionario. Las células madre pluripotentes más estudiadas son las *células madre embrionarias*.

Las *células madre multipotentes* son aquellas que sólo pueden generar células de su misma capa o linaje de origen embrionario.

Las *células madre unipotentes*, también llamadas *células progenitoras* son células madre que tiene la capacidad de diferenciarse en sólo un tipo de células.

Actualmente, tanto la terapia celular como la terapia génica en la FPI están en fases de estudio experimental, por lo que todavía se deberá esperar un tiempo para conocer su efectividad como tratamiento alternativo o asociado a los tratamientos farmacológicos.

La FPI se caracteriza por la alteración del fenotipo de las células alveolares, porque se produce un daño continuado en el epitelio alveolar, conjuntamente con el factor de la apoptosis celular, hace que las células del epitelio alveolar tengan un cambio en su integridad y tengan una respuesta aberrante, que provoca que se activen los fibroblastos, con el consiguiente depósito de colágeno<sup>53</sup>. A continuación, mostramos las principales tipos de células madre mesenquimales (MSC) que pueden ayudar en la reparación pulmonar (Fig. 7):



**Fig. 7** Maliheh Ghadiri, Paul M Young & Daniela Traini (2016) Cell-based therapies for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) disease, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 16:3, 375-387, DOI: 10.1517/14712598.2016.1124085

Durante esta última década la implantación de células madre, con la capacidad de proliferar y diferenciarse a células alveolares, se ha planteado como una estrategia terapéutica. Las células madre mesenquimales son probablemente las células más estudiadas y utilizadas ya que se ha aprovechado su capacidad de diferenciarse a numerosos tipos celulares diferentes.

La FPI se caracteriza por un remodelado fibrótico, heterogéneo, originado por un daño alveolar que produce una reepitalización anómala y apoptosis de las células epiteliales alveolares tipo I y II. Estos avances en el conocimiento de la etiopatogenia de la FPI nos han permitido sugerir que la terapia celular pueda ser un tratamiento prometedor en esta enfermedad. De este modo, se propone que el uso de células mesenquimales exógenas puede promover la correcta reepitelización del alveolo, disminuyendo así la progresión de la enfermedad e incluso revirtiendo las lesiones fibróticas establecida.

Numerosos estudios han evaluado este potencial terapéutico en el modelo de fibrosis por BLM con resultados contradictorios. Los diferentes resultados pueden estar justificados por las diferencias que existen entre este modelo y la FPI, sobretudo la ausencia en ésta de una respuesta inflamatoria, incluso en estadios iniciales, las diferentes dosis de células mesenquimales y vías de administración utilizadas.

La capacidad de las células mesenquimales para diferenciarse en diferentes tipos de células (pluripotencialidad), característica que las convierte en un potencial tratamiento de la FPI, también provoca que puedan presentar efectos adversos. Se ha descrito, en contra de lo esperado, que pueden diferenciarse en fibroblastos, agravando así la enfermedad. También se han descrito lesiones tumorales sólidas pulmonares y extrapulmonares tras su administración.

Una revisión sistemática de *Lalu et al.*<sup>54</sup> de 36 ensayos clínicos que incluían más de 1000 pacientes tratados con células madre por otras enfermedades, mostraba que su administración no se asociaba con efectos adversos a corto plazo. Sin embargo los ensayos clínicos realizados, no sólo en FPI sino también en otras enfermedades, donde se administraban células madre autólogas derivadas de tejido adiposo o placentario, por vía endobronquial o sistémica, no han demostrado aún que sean lo suficientemente seguras a largo plazo.

Dos son los ensayos clínicos realizados hasta la fecha con células madre en pacientes con FPI. Se tratan ambos de estudios en fase I. *Tzouvenkakis et al.*<sup>55</sup> administraron células madre autólogas derivadas de tejido adiposo por vía intratraqueal a 14 pacientes con FPI sin mostrar efectos adversos, deterioro funcional respiratorio significativo a los 12 meses así como tampoco datos de formación de tejido ectópico mediante la realización de una to-

mografía computerizada corporal a los 24 meses. El segundo ensayo clínico es un estudio fase Ib donde se administró por vía intravenosa células mesenquimales derivadas de tejido placentario a 8 pacientes con FPI moderada y severa. Los resultados de este ensayo clínico no fueron tan satisfactorios como el previo. Existía un mayor deterioro funcional respiratorio durante el seguimiento y los pacientes presentaron reacciones adversas tras la administración de células mesenquimales, como la aparición de infiltrados pulmonares (no tumorales) que resolvieron tras la administración de tratamiento antibiótico y un caso de exacerbación aguda de FPI.

Otras alternativas planteadas a las células mesenquimales son la administración de células alveolares tipo II o la administración de células madre derivadas de tejido embrionario. El estudio de *Serrano Mollar et al.*<sup>56</sup> demostraron que la administración intratraqueal de células alveolares tipo II, en un modelo murino de bleomicina, revierte la fibrosis pulmonar y restablece los niveles normales de proteínas del surfactante pulmonar.

En Abril de 2015 se publicó un estudio de *Rajan Jain et al.*<sup>57</sup> en el cual se demostró en modelos de ratones que las células Hopx $\beta$  type 1 pueden dar lugar a células de tipo 2, y viceversa.

Recientemente, Marzo de 2016 se ha publicado el estudio de *Serrano Mollar et al.*<sup>58</sup>, donde en una muestra de 16 pacientes con FPI moderada y progresiva, se sometieron a un trasplante de células alveolares tipo II a través de fibrobroncoscopia. Después de 12 meses de seguimiento, no hubo eventos adversos significativos, ni hubo deterioro de la función pulmonar, ni de los síntomas respiratorios y la extensión de la enfermedad, apoyando la hipótesis de que el trasplante de células alveolares tipo II es seguro y bien tolerado en pacientes con FPI.

Estos resultados indican que la administración de células alveolares tipo II podría convertirse en una terapia para la FPI. Por lo tanto, son necesarios más estudios y ensayos clínicos que nos permitan evaluar el riesgo de presentar efectos indeseados relacionados con la propia naturaleza de las células madre trasplantadas, valorar también sus beneficios, y poder así integrar estos tratamientos en las actuales guías clínicas de la FPI.

### 1.7.8 Terapia génica

Aunque la FPI no es una enfermedad genética, hay numerosos estudios que demuestran que determinados polimorfismos genéticos podrían estar asociados a una mayor susceptibilidad en el desarrollo de FPI<sup>59</sup>.

Al igual que las terapias celulares, la terapia génica sólo se ha realizado a nivel experimental, básicamente inhibiendo o administrando diferentes microRNA que regulan la expresión de diferentes genes relacionados con la FPI.

Los estudios de secuenciación masiva de genes candidatos y la secuenciación de todo el genoma, se espera hallar rápidamente el número de genes relacionados con la FPI.

En Agosto de 2015 investigadores del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y a la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), han descrito el papel de un microARN, el mir-9-5p, para prevenir el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática.

El trabajo publicado por *Fierro-Fernández et al.*<sup>60</sup>, se centra en el papel preventivo del miR-9-5p en la fibrosis pulmonar y peritoneal. Dicha molécula fue elegida a través de un cribado en el que observaron que este miARN se inducía tanto por un mediador de fibrosis, Tgfβ1, como por estrés oxidativo, otro fenómeno que favorece la fibrosis.

Su análisis ha demostrado que la administración de miR-9-5p a ratones que desarrollan fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (el mismo modelo usado en esta Tesis) frena de manera llamativa este proceso. Asimismo, los análisis de biopsias de pacientes con fibrosis pulmonar, así como en células de peritoneo, también han permitido confirmar su participación en la inhibición de la fibrosis.

El estudio detallado del proceso de fibrosis en las células en las que se origina, los fibroblastos, ha permitido conocer algunos de los mecanismos moleculares por los que actúa miR-9-5p y se ha observado que están relacionados con el bloqueo de la ruta de señalización mediada por Tgfβ1 y con la disminución del estrés oxidativo (EO) en los fibroblastos.

Estos resultados sugieren que el propio Tgfβ1, además de disparar señales que favorecen la fibrosis pone en marcha mecanismos que autolimitan su daño, es un ejemplo más del intento de todos los organismos de mantener la homeostasis o estado de equilibrio general de todas las funciones.

Ante dicho hallazgo, los autores proponen el miR-9-5p como un marcador clínico de la fibrosis, concepto que se ha vertido en una patente europea desarrollada por el CSIC y la empresa Gendiag.

La identificación de estos vínculos genéticos con enfermedades mejorará aún más la comprensión de la patogénesis de la FPI. Es por ello, que es necesario un esfuerzo en la investigación básica de la FPI.

### 1.7.9 Cuidados paliativos

La Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>61</sup> define los cuidados paliativos como el “*enfoque que mejora la calidad de vida de pacientes y familias que se enfrentan a los problemas asociados con enfermedades amenazantes para la vida, a través de la prevención y alivio del sufrimiento por medio de la identificación temprana e impecable evaluación y tratamiento del dolor y otros problemas, físicos, psicológicos y espirituales*”.

Sin duda, esta rama de la medicina está íntimamente ligada a las enfermedades oncológicas, que durante años han dispuesto de opciones terapéuticas limitadas. No menos cierto es que la FPI se comporta hasta la actualidad como una enfermedad oncológica, y por lo tanto, los pacientes podrían ser beneficiarios de este servicio. Desgraciadamente, y a pesar del sufrimiento de los pacientes, hoy en día los cuidados paliativos no están incorporados a la rutina del tratamiento de la FPI.

Quizás uno de los grandes problemas de los cuidados paliativos es el propio desconocimiento por parte de los profesionales sobre este campo de la medicina. Uno de los grandes estigmas es que se ha ligado los cuidados paliativos al cáncer y más concretamente, a los últimos días de vida.

Sin embargo, los cuidados paliativos están enfocados para pacientes en fase terminal, es decir, aquellos que no responden al tratamiento específico y en los que se espera por lo tanto que la enfermedad provoque su fallecimiento. Pero este período puede ser variable, y no está específicamente resumido a unos pocos días. Es obvio, que los pacientes con FPI se encuentran frecuentemente en esta situación. Sin embargo, los pacientes con FPI no suelen ser referidos a programas de cuidados paliativos, al menos tempranamente.

Quizás derivado de otra de las dificultades de los profesionales: comunicar adecuadamente a los pacientes el pronóstico y evolución de la enfermedad. Muy frecuentemente se evita esa dolorosa conversación. Probablemente por la carencia de formación o herramientas de comunicación médico-paciente. Pero cuando está conversación se ha realizado en un entorno de adecuado (programas de cuidados paliativos) los pacientes han mostrado su satisfacción por conocer su realidad y poder programar adecuadamente el final de su vida.

Por lo tanto, es vital que los facultativos involucrados en el manejo de pacientes con FPI detecten adecuadamente la fase terminal de la enfermedad, comuniquen a los pacientes la situación y los deriven a programas de cuidados paliativos tempranamente.

No obstante, se ha de considerar un dato muy importante: no existen estudio suficientes en pacientes con FPI para conocer la efectividad de los programas de cuidados paliativos.



Se sabe, por los estudios publicados<sup>62</sup>, que los pacientes con FPI presentan carencias relativas al control de síntomas, soporte psicológico o decisiones entorno al final de vida. Pero pocos estudios han evaluado el impacto de los programas de cuidados paliativos en estas necesidades. No obstante, los pocos estudios realizados en FPI han tenido resultados positivos. Estos son insuficientes por supuesto y hacen falta ensayos randomizados multicéntricos para confirmar estos primeros datos.

Por lo tanto, la efectividad de los programas se extrapola de los resultados presentes en otras enfermedades crónicas, incluidas otras respiratorias como la EPOC.

El tratamiento de la tos, especialmente la nocturna que dificulta el sueño, y de la disnea es un factor determinante para mantener una aceptable calidad de vida en pacientes con FPI. La codeína y otros opiáceos y los glucocorticoides han mostrado cierta eficacia en el control de la tos.

En un ensayo clínico se ha demostrado que la talidomida mejora la tos y la calidad de vida respiratoria (recomendación consistente, calidad de evidencia moderada)<sup>63</sup>. Dosis bajas de morfina pueden mejorar tanto la sensación de disnea como la tos persistente en pacientes con enfermedad avanzada<sup>64</sup>.

Los cuidados paliativos deben ir encaminados a mejorar la calidad de vida de los pacientes y sus familias frente a los problemas inherentes a esta enfermedad progresiva e incurable.

De esta manera, es importante la identificación, valoración y tratamiento precoz de síntomas como el dolor, la disnea y la tos incoercible, así como cualquier otro síntoma relacionado con la progresión de la enfermedad, tanto en la esfera física como psicosocial<sup>65</sup>.

Otro aspecto crucial de los programas de cuidados paliativos es su multidisciplinaridad. Generalmente, los equipos de paliativos incluyen médicos, enfermeros, psicólogos y trabajadores sociales. Gracias a ello se pueden abordar los diversos problemas del paciente de forma integral.

Desgraciadamente, en nuestro país la mayoría de los equipos dedicados a la atención de la FPI carecen de dicha multidisciplinaridad y por lo tanto están más limitados a la hora de resolver los problemas de sus pacientes.

Lamentablemente, en FPI, no existen datos sobre cómo funcionan los programas de cuidados paliativos en nuestro país. Desconocemos quién, cuándo y cómo trata a estos pacientes. Por lo tanto, es primordial conocer la realidad en nuestro entorno para poder diseñar estrategias que mejoran las posibles deficiencias.

En conclusión, los cuidados paliativos pueden ayudar a mejorar la calidad de vida de los pacientes con FPI en fase terminal mediante el adecuado control de los síntomas, soporte psicológico y toma de decisiones respecto al final de la vida.

### **1.7.10 Ventilación mecánica no invasiva**

Un 5-10% de los pacientes diagnosticados de FPI presentan durante la historia natural de su enfermedad un episodio de exacerbación aguda que cursa con insuficiencia respiratoria severa y requiere ingreso en una unidad de cuidados intensivos. Estos pacientes presentan una mortalidad próxima al 90%. La ventilación mecánica invasiva (VMI) mediante intubación intratraqueal no ha demostrado hasta la fecha mejorar el pronóstico de estos pacientes.

Algunos estudios observacionales han demostrado que la ventilación mecánica no invasiva (VMNI) puede ser efectiva para prevenir el inicio de VMI en aquellos pacientes que presentan un aumento del trabajo respiratorio y una  $PaO_2/FiO_2 > 250$ .

*Vianello et al.*<sup>66</sup> en un estudio retrospectivo analizaron recientemente la evolución de 18 pacientes con FPI e insuficiencia respiratoria severa que requirieron ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI) y fueron tratados con VMNI. Mostró que presentaban una mayor supervivencia respecto a los datos reportados en las series previas de pacientes de similares características tratados con VMI, con una tasa de éxito de la VMNI del 45%. El fracaso de la VMNI estaba relacionado directamente con los niveles de NT-proBNP al ingreso.



---

---

# **II**

## **FUTURO DE LA INVESTIGACIÓN EN FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA**



En los últimos años hemos vivido un gran avance en el conocimiento de la FPI debido a diversos motivos.

Por un lado, se ha producido una clarificación de los criterios diagnósticos de la enfermedad. Además, la alta mortalidad por la ausencia de un tratamiento efectivo, ha generado que exista una mayor preocupación sobre la enfermedad en el ámbito científico y social, lo que ha provocado que la investigación en FPI haya tenido un incremento exponencial en los últimos años.

Diversos ensayos clínicos se han realizado con nuevos fármacos que intentan modificar el curso de la FPI.

A pesar de ello, exceptuando la Pirfenidona, y el Nintedanib ya a disposición de los pacientes actualmente, la mayoría de estudios no han demostrado un beneficio en el tratamiento de estos pacientes.

Por este motivo, recientemente desde el National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI)<sup>67</sup> se ha coordinado una serie de sesiones de trabajo multidisciplinar entre diversos investigadores y profesionales en las que se han identificado diversas áreas de investigación que bajo su consideración han de ser prioritarias en la investigación futura de la FPI.

Se definen seis áreas de investigación a considerar en el futuro de la investigación en FPI:

### **Investigación en el daño epitelial alveolar y su reparación aberrante**

Actualmente se considera que el daño recurrente en el epitelio alveolar y la incapacidad para resolver dicho daño es el principal origen de la FPI. En éste daño recurrente, se cree que un grupo de células alveolares epiteliales alteradas o “reprogramadas” podrían tener un papel en evitar la correcta reparación de dicho daño alveolar.

Por otro lado, es necesario explorar como se relacionan dichas células epiteliales con las otras estirpes celulares que también se relacionan con el desarrollo de la FPI. Finalmente, todavía se desconoce el papel que puedan jugar las células progenitoras en la reparación del daño alveolar y su posible contribución en la FPI.

## **El papel de la matriz extracelular**

El estudio de la matriz extracelular está teniendo un creciente interés por su potencial papel en la patogénesis de la FPI. Aún así, se desconocen con detalle cuáles son los componentes de la matriz celular (y sus receptores) que promueven el remodelado fibrótico.

En este proceso es de interés también evaluar las características mecánicas de la rigidez de la matriz extracelular en la FPI y como ésta afecta a las células. El desarrollo de modelos que simulen la matriz extracelular de los pulmones pueden ayudar a clarificar su papel en la FPI.

## **El desarrollo de modelos animales preclínicos**

El modelo animal más frecuentemente usado en el estudio de la fibrosis ha sido el de instilación de bleomicina.

Por ello, este modelo y otros definidos distan aún mucho de ser modelos óptimos para el estudio de FPI, lo que puede explicar la falta de concordancia de muchos tratamientos aplicados en animales que no han funcionado en su aplicación en humanos.

Es necesario por lo tanto desarrollar modelos que sean de mayor validez en su aplicación para futuros estudios en humanos.

## **El papel de la inflamación y la autoinmunidad**

Aunque las células y mediadores inflamatorios no parecen tener un papel central en la patogenia de la FPI, sí que ejercen un papel al inicio y en algunos estados de la enfermedad (por ejemplo, es probable en las exacerbaciones). Se ha de seguir trabajando en el estudio de estos factores e identificar qué pacientes pueden beneficiarse de tratamientos que actúen en dichas vías.

## **Determinantes genéticos, epigenéticos y ambientales**

El descubrimiento reciente de un polimorfismo<sup>27</sup> (SNP, single-nucleotide polymorphism) en el promotor del gen MUC5B, junto con la identificación de un grupo de proteínas (TOLLIP) que parecen estar asociadas con la incidencia y el pronóstico de la FPI, han abierto nuevas vías para explorar la predisposición genética en la FPI.

Ante los hallazgos recientes de la epigenética y el desarrollo de las aplicaciones “omics”, puede ser interesante la comparación con la fibrosis en otros órganos y desarrollar el enfoque personalizado de la FPI.

### **Traslado de los hallazgos de investigación en el diagnóstico y el tratamiento**

La base de la investigación translacional (ésta Tesis es un buen ejemplo de ello) es poder aplicar en la asistencia clínica los hallazgos previos de la investigación básica. Diferentes objetivos se han de establecer a este término en la FPI.

Por un lado, el desarrollo de diferentes biobancos con datos clínicos fiables es importante, junto al desarrollo de biomarcadores que relacionen las diferentes etapas clínicas de la enfermedad con el pronóstico.

Respecto a los ensayos clínicos, es importante crear infraestructuras locales que permitan el acceso de los pacientes a los diversos ensayos.

Estamos viviendo unos tiempos en la FPI en los que, aunque todavía existen grandes incógnitas respecto a esta enfermedad, nuevas áreas de investigación están apareciendo.

Áreas que hacen pensar que la investigación en la FPI pueda progresar y de esta manera poder tener tratamientos adecuados que permitan mejorar el pronóstico de los pacientes.





---

---

# III

## JUSTIFICACIÓN



La FPI es la más frecuente y la de peor pronóstico de las enfermedades pulmonares intersticiales y sólo engloba patologías que presentan una forma de neumopatía con fibrosis intersticial crónica, limitada al pulmón y asociada a un patrón histopatológico de neumonía intersticial usual en el que se observan áreas de fibrosis pulmonar que coexisten con focos de proliferación fibroblástica. Los pacientes con FPI tienen una supervivencia media entre 2.5 y 5 años desde el inicio de los síntomas; sólo superado en mortalidad por algunos cánceres como el de pulmón o páncreas.

Estas evidencias clínicas demandan un esfuerzo en la investigación experimental con carácter traslacional. En concreto, un esfuerzo dirigido al conocimiento de los genes y mecanismos moleculares involucrados en la FPI. En este sentido, el uso de modelos animales para la investigación de los mecanismos de fibrinogénesis se basa en la similitud tanto estructural, bioquímica y molecular con los humanos y por ello permite estudiar en tiempo real las interacciones genéticas, bioquímicas y medio ambientales que causa la fibrosis pulmonar.

Los procesos que regulan la fisiopatología de la fibrosis pulmonar se inician desde las primeras fases de la lesión. De forma que en el pulmón con lesiones fibróticas se produce una situación de estrés oxidativo celular crónico responsable del daño tisular irreversible. La capacidad proliferativa, regenerativa e inmunomoduladora de las ADSC trasplantadas por vía respiratoria, no utilizada antes en modelos de fibrosis pulmonar, podrían paliar esta situación de estrés oxidativo celular y así como las lesiones fibróticas pulmonares.

Es por ellos que con una base científica sólida nos propusimos en este estudio experimental, valorar los efectos de las ADSC, por vía trastraqueal en un modelo de FP inducida por BLM, con potencial aplicabilidad traslacional.

Los conocimientos derivados no sólo podrían ayudar a entender mejor la fisiopatología de la FPI, sino ayuda a sentar una base más sólida para identificar dianas moleculares que permitan desarrollar estrategias terapéuticas específicas y, en última instancia, ayudar a mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes con FPI.



---

---

# **IV**

## **OBJETIVOS**



# 1

---

**Desarrollar un modelo válido de Fibrosis Pulmonar en ratas inducida por Bleomicina donde estudiar la eficacia de distintas alternativas terapéuticas.**

# 2

---

**Valorar la capacidad de proliferación, diferenciación y reparación tisular de las ADSC en el modelo de Fibrosis Pulmonar.**

# 3

---

**Analizar la expresión génica en búsqueda de biomarcadores de Fibrosis Pulmonar y que nos ayuden a monitorizar la respuesta al tratamiento con ADSC.**





---

---

# **V**

## **MATERIAL Y MÉTODO**



5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Hemos realizado un estudio experimental, en el cual se utilizaron 29 ratas macho (*Rattus norvegicus*), de la cepa Sprague-Dawley que se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos (Tabla 6):

GRUPOS DE ESTUDIO	Descripción
<b>Grupo Control</b> (n=3)	Animales normales a los que no se les instiló nada.
<b>Grupo Sham</b> (n=6)	Se les instiló suero fisiológico vía intratraqueal y a los 30 días se extrajeron muestras de pulmón derecho e izquierdo.
<b>Grupo BLM</b> (n=6)	Al que se les instiló BLM vía intratraqueal para producir fibrosis pulmonar y a los 28 días se extrajeron muestras de pulmón derecho e izquierdo.
<b>Grupo BLM+ADSC-2d</b> (n=6)	Al que se les instiló BLM vía intratraqueal, y se administró ADSC por la misma vía y por dosis única, a los 2 días de la instilación de la BLM. A los 28 días de instilada la BLM se extrajeron muestras de pulmón derecho e izquierdo.
<b>Grupo BLM+ADSC-14d</b> (n=8)	Al que se les instiló BLM vía intratraqueal, y se administró ADSC por la misma vía y por dosis única a los 14 días de la instilación de la bleomicina. A los 28 días de instilada la BLM se extrajeron muestras de pulmón derecho e izquierdo.

## 5.2 MODELO EXPERIMENTAL

En la actualidad, el uso de animales de laboratorio todavía es un requisito indispensable para la investigación traslacional. La creación de un modelo experimental es el primer obstáculo a superar cuando se inicia el estudio de una enfermedad. Para que se pueda considerar como apropiado, el modelo experimental debe reproducir los rasgos característicos de la enfermedad.

Para ello, se pueden utilizar modelos animales, celulares, e incluso modelos computacionales. A partir de modelos animales los investigadores podemos ampliar el conocimiento de las interacciones celulares y los mecanismos moleculares implicados en el progreso de la enfermedad.

En el caso concreto de la FPI, el modelo animal ideal sería aquel que lograra reproducir fibrosis pulmonar de un modo progresivo e irreversible, de manera que los animales presentaran todas las características del patrón histológico de NIU.

También debe ser reproducible, económico y que se pueda realizar en un espacio de tiempo relativamente corto. Por desgracia, el modelo animal perfecto no existe. Además, en el caso de la FPI el mero hecho de crear un modelo animal ya implica tener que dejar de lado que se trata de una enfermedad de origen desconocido.

A pesar de todo, existen varios modelos animales que consiguen reproducir, con mayor o menor similitud, algunos de los rasgos más característicos de la fibrosis pulmonar.

El modelo animal más utilizado en esta patología es el que se provoca mediante la instilación intratraqueal de sulfato de BLM, aunque también están muy extendidos el uso de sílice, isocianato de fluoresceína, irradiación, y la expresión/inhibición de genes específicos mediante la introducción de vectores virales o la utilización de animales transgénicos.

El sulfato de BLM es un fármaco antineoplásico que se utiliza para tratar diferentes tipos de cáncer. Está formado por una mezcla de glucopéptidos citotóxicos aislados de la bacteria *Streptomyces verticillus* y actúa provocando daño en el DNA e induciendo la apoptosis de las células cancerígenas. El motivo de utilizar BLM para inducir fibrosis pulmonar en animales de investigación es debido a que uno de sus efectos secundarios es el desarrollo de fibrosis pulmonar.

El modelo de BLM presenta muchas variaciones en cuanto a las dosis, vías de administración, y especie animal. Se ha administrado bleomicina a rata, ratón, hámster, cobaya,

conejo, perros y primates, administrando una única dosis o dosis repetidas, y por vía intravenosa, intraperitoneal, intratraqueal, intranasal o subcutánea.

Lo más frecuente es administrar una única dosis de BLM mediante instilación intratraqueal. La liberación de BLM directamente a los pulmones provoca la muerte de las células epiteliales por apoptosis.

Durante la primera semana post administración se desencadena una marcada respuesta inflamatoria con infiltración de neutrófilos y linfocitos. A partir del décimo día empieza a resolverse esta situación y se inicia el desarrollo de la fibrosis. Esta fase, denominada fase fibrótica, persiste durante las 3-4 semanas post instilación y se caracteriza por una excesiva deposición de proteínas de la matriz extracelular. Sin embargo, después de este periodo los animales empiezan a recuperarse por sí mismos, retornando a un estado comparable al fisiológico, sin evidencias significativas de fibrosis en el tejido pulmonar después de 6 semanas de la instilación de BLM.

Las principales ventajas de este modelo son, en primer lugar, la posibilidad de administrar de un modo sencillo la BLM directamente en el pulmón y, en segundo lugar, la brevedad del tiempo necesario hasta que se desarrolla la fibrosis.

Las desventajas son, por un lado, la capacidad de recuperación del tejido lesionado y, por otro, que este método no logra reproducir en su totalidad las principales características de NIU en algunas especies animales. En este sentido el desarrollo de fibrosis mediante la administración de BLM es reducido o inexistente en algunas cepas de ratón.

De todas maneras y a pesar de las limitaciones, este modelo ha sido y sigue siendo ampliamente utilizado.

### **5.2.1 Inducción a la Fibrosis Pulmonar**

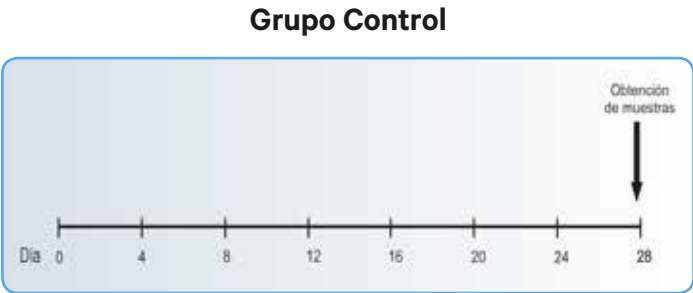
Las intervenciones se realizaron bajo anestesia general sobre una mesa quirúrgica termorregulada. Se siguieron las normas legales vigentes para el cuidado y la protección de los animales de experimentación. La anestesia se realizó con medetomidina subcutánea (s.c.) y ketamina intraperitoneal (i.p) ajustada a su peso. Una vez anestesiado el animal se realizó una intubación orotraqueal y se ventiló al animal con un volumen corriente (VC) de 1ml/100g de peso.

Para la inducción de la Fibrosis Pulmonar, a todos los animales se les instiló por intubación intratraqueal (IOT) Bleomicina (BLM) (Fig. 10) (2,5mg/kg de peso en 0.4 ml de suero fisiológico), salvo el grupo Sham (Fig. 9) que sólo se le instiló 0.4 ml de suero fisiológico.

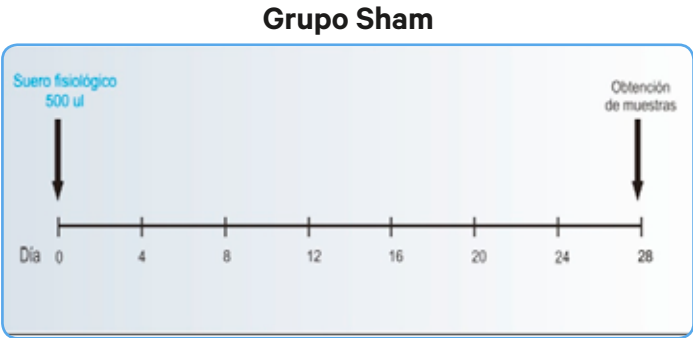
Después de la administración de BLM, el inicio de una respuesta inflamatoria aguda que dura hasta 8 días, seguido por los cambios resultantes en fibrogénicos deposición de la matriz y la distorsión de la estructura de pulmón a 28 o 35 días. Tratamientos durante los primeros siete días sería considerado “preventiva”, mientras que los tratamientos durante las últimas etapas después de 7-10 días serían considerado “terapéutico”.

Posteriormente bajo anestesia y con el mismo protocolo anestésico que para instilar la BLM, a los animales se les aplicó ADSC por vía intratraqueal a los 2 días (Fig. 11) Grupo BLM + ADSC-2d de instilada la dosis de única de BLM, y a los 14 días (Fig. 12) Grupo BLM + ADSC -14d., en dosis única ( $2 \times 10^6$  células en un volumen de 100  $\mu$ l).

Las ADSC fueron aisladas de tejido adiposo inguinal de tres machos donantes rata Sprague-Dawley de 3-5 meses de edad que no fueron incluidos en el estudio. Después de ser anestesiados mediante inyección intraperitoneal de 50 mg / kg de ketamina (Ketolar®), el tejido adiposo se retiró en condiciones estériles. Brevemente se procedió a su homogeneización y al lavado con solución salina estéril, el tejido adiposo se digirió enzimáticamente durante 1 hora. El sedimento obtenido después de la centrifugación se resuspendió en medio de cultivo (DMEM, FBS al 5% , 1X P / S ) y las células se sembraron en una matriz que se mantuvo en una incubadora a 37 ° C con 5 % de CO2 hasta que la monocapa de células alcanzaron la confluencia. Las células se hicieron crecer y se cultivaron a través de varios pasajes por digestión con tripsina para producir un número suficiente de células, tanto para la crioconservación como para este estudio.

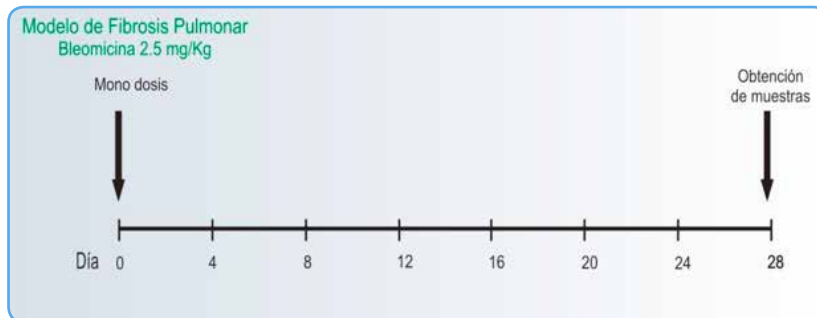


**Fig 8. Grupo Control.** Animales a los que no se les realizó ningún tratamiento experimental.



**Fig 9. Grupo Sham.** Animales a los que se les instiló suero fisiológico por vía intratraqueal en el día 0.

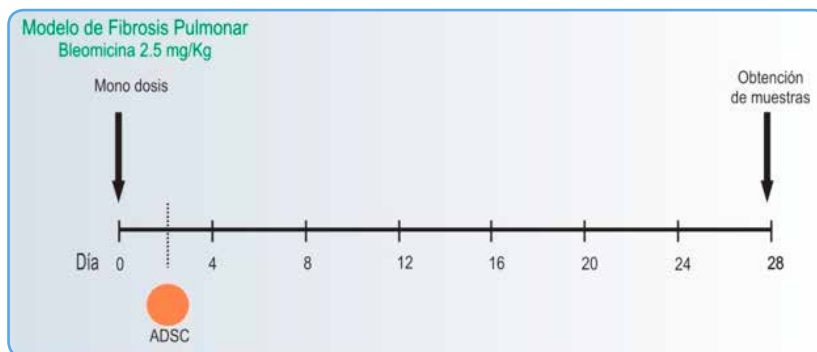
### Grupo BLM



**Fig 10. Grupo BLM.**

Animales a los que se les instiló BLM (2,5 mg/Kg de peso) en dosis única por vía intratraqueal en el día 0.

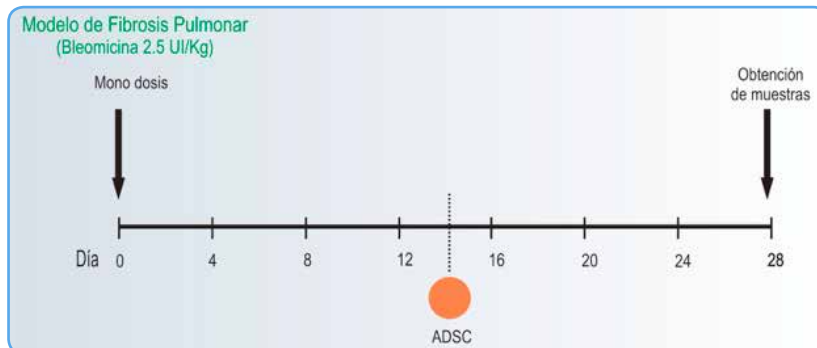
### Grupo BLM+ADSC-2d



**Fig 11. Grupo BLM+ADSC-2d.**

Animales a los que se les aplicó ADSC por vía intratraqueal a los 2 días de instilarle la dosis única de BLM. Los animales fueron sacrificados a los 28 días de instilarle la BLM (día 0).

### Grupo BLM+ADSC-14d



**Fig 12. Grupo BLM+ADSC-14d.**

Animales a los que se les aplicó ADSC por vía intratraqueal a los 14 días de instilarle la dosis única de BLM. Los animales fueron sacrificados a los 28 días de instilarle la BLM (día 0).



5.2.2 Escala de valoración de la severidad de la Fibrosis Pulmonar

Escala de Ashcroft<sup>68</sup>

Es una escala numérica continua para determinar el grado de fibrosis en las muestras de pulmón y fue ideada para la correlación con otras variables pulmonares tales como las pruebas de función pulmonar.

La clasificación se califica en una escala de 0 a 8, utilizando el promedio de las puntuaciones del campo del microscopio.

La fibrosis se mide en pequeñas muestras de tejido (1cm) que pueden proporcionar una descripción detallada de los cambios en un pulmón. (Fig. 13)

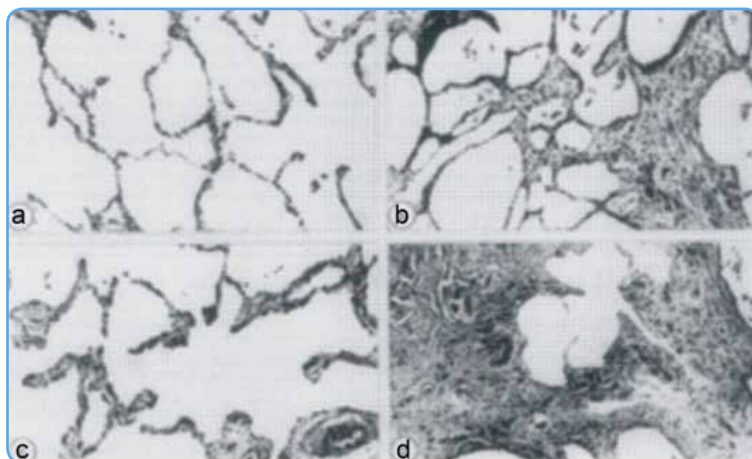
Toda la zona de la imagen del microscopio circular se considera y se observa si el parénquima en el campo es normal o fibrótico. Si el tejido normal predomina se le asigna una puntuación de 0. En cada campo se da la puntuación correspondiente al grado de fibrosis predominante (0, 2, 4, 6 o 8), y en los casos en que es dudoso asignar a uno u otro de esos valores, se puntúa como el valor intermedio (1, 3, 5 o 7). (Tabla 7)

**Tabla 7. Escala de Ashcroft.  
Criterios para establecer el grado de fibrosis**

Grado de Fibrosis	Características Histológicas
0	Pulmón normal
1	Mínimo engrosamiento fibroso de paredes alveolares o bronquiolares
2	Engrosamiento fibroso moderado de las paredes sin daños evidentes en la arquitectura del pulmón
3	
4	Aumento de la fibrosis con daño en la estructura definida de pulmón y la formación de bandas fibrosas o pequeñas masas fibrosas
5	
6	Distorsión grave de la estructura y grandes áreas fibrosas; "pulmón en panal de abeja" se coloca en esta categoría
7	
8	Obliteración fibrosa total del campo alveolar

Ashcroft T, et al. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. J Clin Pathol 1988;41:467-470

### Escala de Ashcroft



**Fig 13.** Diferentes imágenes de severidad de fibrosis según Escala de Ashcroft

## 5.3 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para esta tesis doctoral se utilizaron 29 ratas (*Rattus norvegicus*), machos, de la cepa Sprague-Dawley con un peso comprendido entre 300 y 400 gramos, y entre 3.5/4 meses de edad (Fig.14). Estos animales procedieron de la colonia criada en el animalario de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín de Las Palmas de Gran Canaria, a partir de una pareja de reproductores (1ª generación) procedente del Centro de producción Animal de Harlan Interfauna Ibérica S.L. (Barcelona, España).

Todos los animales fueron destetados a los 21 días de edad, y se ubicaron en jaulas de macrolón de 20 x 35 x 55 cm (Allentown Inc., Panlab S.L., Barcelona, España), las cuales contenían 4 animales por jaula y con las condiciones idóneas de estabulación.

El ciclo de luz dentro del animalario se programó a 12 h. de luz y 12h. de oscuridad y una intensidad de 270 lux teniendo un grado de humedad relativa de 45/ 55%. El sistema de ventilación permitió 16 renovaciones/hora y la temperatura ambiente fue de  $22^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### Rata de la cepa Sprague-Dawley



Fig 14. Rata de la cepa Sprague-Dawley

El régimen de alimentación administrado ha sido de un pienso concentrado para roedores suministrado *ad libitum* con una dieta comercial de mantenimiento en pellets con la siguiente composición: proteína bruta 15,6%; materia grasa bruta 2,8%; celulosa bruta 4,8%; cenizas brutas 4,6%; vitamina A 7500 UI/Kg.; CuO 14,7 ng/Kg.; vitamina D; 80 mg/Kg de vitamina E; productos y subproductos de semillas de oleaginosas, productos de panadería y de fabricación de productos alimenticios, minerales, semillas de oleaginosas y productos de pescado (R.02-E Standard Diet, Prolabor, España). Se suministró agua *ad libitum* con pH 6,5 £ 8,5; y el encamado consistía en viruta de bagazo de caña desmeollado.

La monitorización microbiológica de rutina, de acuerdo a las recomendaciones de la FELASA, no ha revelado presencia de patógenos en ratas durante el periodo del estudio experimental<sup>69</sup>.

Siguiendo las recomendaciones de FELASA, se ha supervisado en todo momento la conducta, el estrés y el bienestar de los animales<sup>70</sup>. De este modo se han valorado signos fisiológicos oculares (hematoporfirina y hundimiento del globo ocular), respiratorios (estornudo, flujo nasal y frecuencia respiratoria), aspecto externo (piloerección, lordosis, deshidratación y pérdida de peso) y signos de actividad anormal (somnolencia, anorexia, automutilación y vocalización).

Se han seguido las normas internacionales y nacionales vigentes sobre cuidado y protección de los animales de experimentación, bajo condiciones sanitarias en la categoría

de convencional limpio de acuerdo a las recomendaciones y exigencias recogidas en el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (*National Research Council*, 1996), Directiva del Consejo Europeo 86/609 (Directiva-Comisión de las Comunidades Europeas, 1986), Real Decreto Español 1201/2005 (Ministerio Presidencia, 2005) y la Ley 32/2007 (Cortes Generales, 2007).

## 5.4 SALAS, EQUIPOS Y MATERIAL INVENTARIABLE

Para el desarrollo del modelo experimental, se ha utilizado el quirófano I (Fig. 15), para animales inmunocompetentes con nivel de contención biológica II y las salas de preoperatorio y postoperatorio de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín (Fig. 15).

Así como, ventiladores Servo 900® (Siemens-Elema, Suecia), microscopio de pie Zeiss OPMI® 9-12,5x (West, Alemania), nevera Misa® de 4 °C y congelador Revco® de -70 °C.

### Quirófano 1



**Fig 15.** Quirófano de la Unidad de investigación del HUGC Dr. Negrín.

## 5.5 MATERIAL QUIRÚRGICO

Para garantizar un mínimo de esterilidad se han utilizado paños quirúrgicos estériles, así también bisturís nº 22, jeringas de insulina, agujas 25 G, tijeras de Metzembraum y Mayo, pinzas de disección, pinzas de Adson, pinzas de microcirugía (relojero), tijeras de microcirugía, tijeras de microcirugía Westcott, porta aguja Baumgartner, blefarostato Murdock, micro-portaguja Castroviejo estriado, micro porta aguja Barraquer, suturas de Vycril® (Jonhnsen and Jonhnsen, Madrid, España) y seda negra 3/0 (Silkan®. B. Braun Surgical S.A. España), ligaduras de Surgipro II® de 6/0 y 7/0 (Tyco-Healthcare, USA), torundas y gasas estériles.

## 5.6 MEDICACIÓN ANESTÉSICA Y ANALGÉSICA

Los fármacos que se han empleado en la anestesia de los animales han sido: lidocaína 1% (Xilonibsa®, Inibsa, Barcelona, España), medetomidina (Domtor®, Pfizer, Madrid, España), ketamina (Ketolar 500®, Pfizer, Madrid, España) y atropina 1% (Atropina®, Braun, Madrid, España). El efecto de la medetomidina se ha revertido con su antagonista, el atipamezol (Antisedan®, Pfizer, Madrid, España.).

Como analgésico postoperatorio se ha empleado la buprenorfina (Buprex®, Shering-Plug. Barcelona. España).

## 5.7 MATERIAL UTILIZADO PARA MEDICIONES

Las muestras se fijaron en formol 3,7 - 4% en recipientes de vidrio oscuro y a temperatura ambiente. La deshidratación se llevó a cabo con alcoholes y xilol (Leica, TP-1050, Leica Instruments, Gmbh, Nussloch, Alemania). Las muestras se incluyeron en parafina (Leica, Reichert-Jung Histoembedder, Leica Instruments, Gmbh, Nussloch, Alemania). Para la preparación de las secciones se utilizaron un microtomo (Leica, LR-2055, Leica Instruments, Gmbh, Nussloch, Alemania), un calentador de agua P Selecta y portaobjetos 76 x 26 Knittel Glaber.

Para la coloración de las muestras en Hematoxilina-Eosina se necesitó los siguientes materiales: hematoxilina, alcohol etílico, potasio alume, agua destilada, óxido mercúrico, ácido acético glacial, eosina soluble en agua.

Para purificar el RNA se usó GITC-fenol/cloroformo. El bromuro de etidio de Pierce (Rockford, IL). Para la síntesis del cADN se usó el kit Script cADN síntesis (BioRad, Barcelona-España). Los cebadores fueron fabricados por Thermo Electrón (www.thermo.co). Para realizar las PCRs a tiempo real se usó SYBR Green (Foster City, CA). El resto de reactivos procedían de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

## **5.8 RECOGIDA Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

### **5.8.1 Procesamiento de las muestras**

Para la obtención de muestras, los animales fueron profundamente anestesiados con Ketamina y medetomidina y conectados al ventilador mecánico. Se reabrió la cavidad torácica mediante esternotomía media y se tomó una muestra de 1 ml de sangre con citrato por punción intracardiaca en un tubo que se centrifugó a 3000rpm durante 10 min para obtener el plasma.

Se tomaron muestras en fresco del pulmón derecho y del izquierdo que se congelaron inmediatamente en nitrógeno para ser almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  y que se destinaron a estudios genéticos y apoptóticos. El resto del pulmón se conservó en formol y se destinó al estudio histológico.

### **5.8.2 Mediciones**

#### **5.8.2.1 Respuesta clínica**

Mediante valoración de la conducta, signos de estrés y bienestar de los animales según la clasificación internacional de FELASA<sup>70</sup> y radiológica a la fibrosis. Si se producía el fallecimiento antes del periodo de sacrificio, se valoró la posible causa de la muerte mediante necropsia.

#### **5.8.2.2 Estudio histológico**

A fin de determinar el grado de fibrosis se realizó mediante técnicas anatomopatológicas convencionales: tinción de hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y microscopía óptica. Se aplicó el sistema de clasificación de la Escala de Ashcroft<sup>68</sup> para fibrosis pulmonar patológica previamente descrito, desde grado 0 (ausencia de fibrosis) a grado 8 (fibrosis total).

### 5.8.2.3 Determinaciones génicas

Se determinó la expresión de genes relacionados con el estrés celular como son: proteína de dominio Hsp27, Vegfa, Nfkb, IL6, Col4, IL1, Tgf $\beta$ 1.

## 5.9 ANÁLISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico se ha realizado mediante el paquete estadístico SPSS v15,0 para Windows (2005, SPSS Inc. Illinois, USA). La expresión de los genes la mostramos como media con su desviación estándar (SD). Las determinaciones histológicas se expresan en porcentajes. Para los contrastes de hipótesis hemos considerado un error  $<0,05$ . Hemos aplicado el test de la U de Mann Whitney para dos muestras independientes para verificar las diferencias en el peso y en la expresión de los genes, ya que estas no siguen una distribución normal (Test de Kolmogorov- Smirnov). Se ha realizado el Test de ChiCuadrado con la razón de verosimilitud (RV) para valorar la asociación de las determinaciones histológicas de los tratamientos versus los controles. Para la elaboración de los gráficos se utilizó el software GraphPad Prism 6.







---

---

# **VI**

## **RESULTADOS**



6.1 EVOLUCIÓN CLÍNICA POSTOPERATORIA

La dosis de BLM intratraqueal instilada (Fig. 16) (2.5 UI/Kg) no produjo mortalidad en ninguno de los animales. No se observaron diferencias significativas entre los grupos Sham, BLM y BLM+ADSC-2d y BLM+ADSC-14d en los parámetros clínicos evaluados de temperatura y signos de dolor (piloerección, dacriorrea, inmovilización, ojos cerrados).

Los animales del grupo Sham presentaron una buena evolución y su recuperación del peso fue mucho más rápida que la del grupo BLM. En los animales del grupo BLM se observó un grado leve dificultad respiratoria que ocasionaba una disminución de su actividad física. Esta condición fue remitiendo con el tiempo y la mejoría del animal fue directamente proporcional a la recuperación del peso del animal. En el grupo BLM+ADSC-2d y BLM+ADSC-14d, los animales presentaron una buena evolución postoperatoria y recuperaron antes la actividad física con respecto al grupo BLM.

Intubación orotraqueal



Fig. 16 Imagen de Intubación orotraqueal de uno de los animales del estudio

En la Tabla 8, se muestran los pesos medios de cada grupo de estudio.

Tabla 8. Tiempo de recuperación al peso inicial del estudio, después de instilación de BLM

GRUPO ESTUDIO	PESO INICIAL	PESO FINAL	p-valor
Control (n=3)	323 (317,5 – 323,5)	407 (404 – 414,5)	0,25
BLM (n=6)	336 (326,75 -343,75)	356,5 (351,25 – 360,25)	0,03*
Sham (n=6)	452.5 (445,75 – 469)	459 (411,25 – 512)	0,94
BLM+ADSC-2d (n=6)	302 (297,25 – 304,5)	379 (374,25 – 381,5)	0,03*
BLM+ADSC-14d (n=8)	330 (326 – 331,25)	355 (345,25 – 368,25)	0,008*

\* p< 0.05

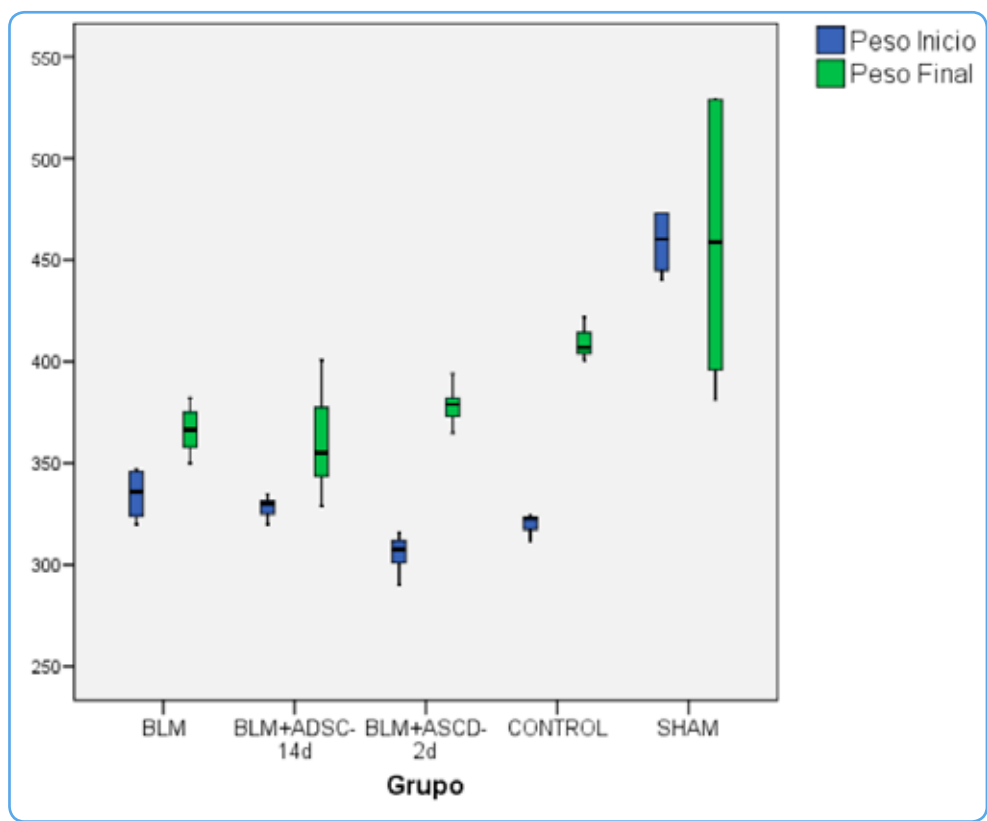
Podemos observar las diferencias de peso entre cada grupo de estudio desde el momento inicial del estudio (día 0) y el momento final (día 28) en cada uno de los grupos.

Debido al reducido tamaño muestral, las variables se describen como medianas y percentil 25 y percentil 75.

Se encuentran diferencias de peso significativas en los grupos BLM, BLM+ADSC-2d y BLM+ADSC-14d.

A continuación, mostramos gráficamente la diferencia del peso de los animales diferenciados por grupos en el transcurso de los 28 días del estudio (Fig. 17).

**Diferencia de pesos por grupo de estudio entre el inicio y final del estudio**



**Fig. 17** Diferencia de pesos por grupo de estudio entre el inicio y final del estudio

Se creó una nueva variable como la resta entre el peso final menos el peso inicial. Y comparamos si hay diferencia de peso entre cada grupo de ratas.

Para ello, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Como el resultado es significativo, se aplican las comparaciones post-hoc para comprobar entre que grupos hay diferencias significativas:

Hay diferencias significativas de diferencia de peso entre los siguientes tipos ratas:

Control vs BLM, Control vs Sham, BLM vs BLM+ADSC-2d, BLM+ADSC-14d y Sham vs BLM+ADSC-2d y BLM+ADSC-14d.

## 6.2 DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DE LOS PULMONES

En los animales del grupo Control y Sham (Fig. 18) se observó que ambos pulmones presentaban una apariencia normal, coloración rojo brillante, consistencia blanda y una adecuada expansión. No se observaron adherencias entre el pulmón y pleura parietal y ni presencia de focos atelectásicos o fibróticos.

### Grupo Sham



**Fig. 18** Bloque pulmonar de un animal del grupo Sham

Los pulmones del grupo BLM, (Fig. 19) presentaban lesiones bilaterales, caracterizadas por áreas parcheadas de color rojo oscuro y de consistencia más dura, sobre todo en la zonas más próximas al bronquio principal. Se observó ausencia de la función ventilatoria en esas zonas a pesar de las maniobras de reclutamiento alveolar. Ninguno de los animales del grupo presentó adherencias pleuro-pulmonares

### Grupo BLM



**Fig. 19** Bloque pulmonar de un animal del grupo BLM

En los grupos de animales que se les trasplantó ADSC, grupos BLM+ADSC-2d (Fig. 20) y el grupo BLM+ADSC-14d (Fig. 21) las lesiones observadas fueron de menor tamaño y cantidad que las descritas en el grupo BLM. El tejido pulmonar presentaba una adecuada función ventilatoria de forma general, y las zonas parcheadas se recuperaban tras las maniobras de reclutamiento alveolar. Ninguno de los animales del grupo presentó adherencias pleuro-pulmonares.

### Grupo BLM+ADSC-2d



**Fig. 20** Bloque pulmonar de un animal del grupo BLM+ADSC-2d

### Grupo BLM+ADSC-14d

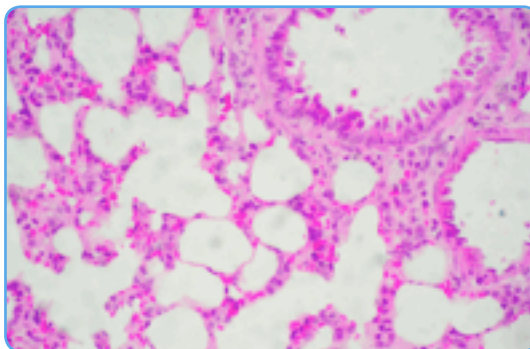


**Fig. 21** Bloque pulmonar de un animal del grupo BLM+ADSC-14d

## 6.3 DETERMINACIONES HISTOLÓGICAS

En el estudio microscópico del grupo control no se observaron alteraciones de la morfología pulmonar. En los animales del grupo Sham al que sólo se administró suero fisiológico, se observó un leve engrosamiento de las paredes alveolares de forma aislada, con una morfología pulmonar normal (Fig. 22).

### Grupo Sham

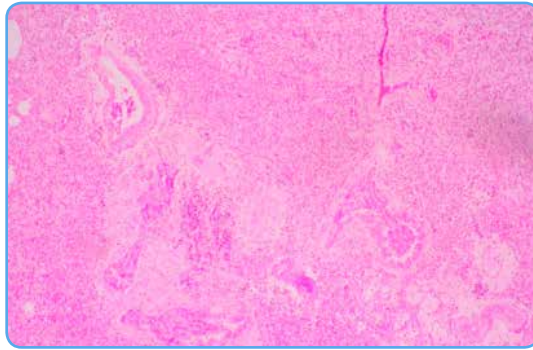


**Fig. 22** Vista histológica de pulmón de un animal del grupo Sham, donde se observan los espacios aéreos preservados y un leve engrosamiento irregular e los tabiques alveolares (Hematoxilina-eosina x10).



En el estudio microscópico del grupo BLM se observó una desaparición casi total de los espacios alveolares, ocupado por macrófagos alveolares, células epiteliales alveolares con núcleo prominente, algunos hematíes y muy pocos linfocitos. Además se observa proliferación fibroblástica con distorsión arquitectural e imágenes de bronquiolización alveolar (Fig. 23).

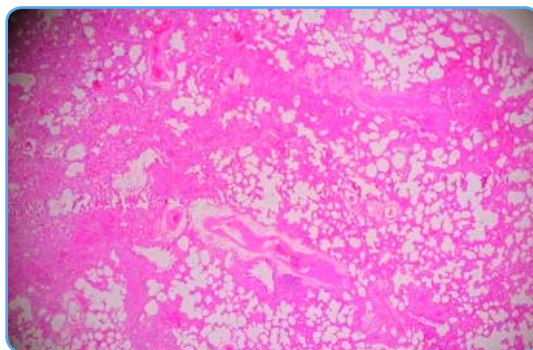
### Grupo BLM



**Fig. 23** Vista histológica de pulmón de un animal del grupo BLM donde se observa consolidación casi completa del parénquima, con amplias áreas de fibrosis y ocupación de los espacios alveolares. (Hematoxilina-eosina X4).

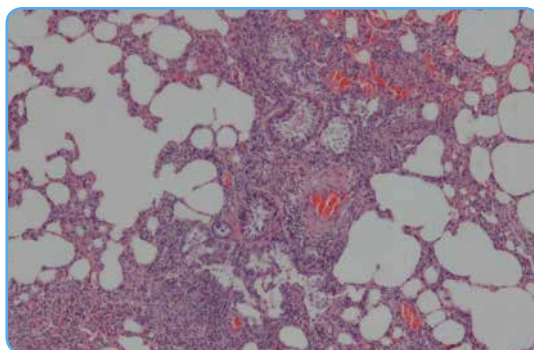
En los grupos BLM+ADSC-2d (Fig. 24) y BLM+ADSC-14d (Fig. 25), observamos una recuperación parcial del espacio aéreo de aproximadamente un 35-40%, pero sin restablecimiento completo de la estructura normal de las paredes alveolares, que sigue ocupada por las mismas células que obliteran el resto del parénquima pulmonar. Se observaron también cambios reactivos del epitelio con bronquiolización alveolar.

### Grupo BLM+ADSC-2d



**Fig. 24** Vista histológica de pulmón de un animal del grupo BLM+ADSC-2d donde se observa fibrosis parcheada, con engrosamiento de septos alveolares y cierta preservación de los espacios aéreos. (Hematoxilina-eosina x 4).

### Grupo BLM+ADSC-14d



**Fig. 25** Vista histológica de pulmón de un animal del grupo BLM+ADSC-14d donde se observa una moderada distorsión del parénquima pulmonar, con presencia de áreas predominantemente fibrosas alternando con otras mejor conservadas. En las zonas fibrosas se observan imágenes de bronquiolización del epitelio alveolar y presencia de macrófagos alveolares. (Hematoxilina-eosina x 4)".

No se observaron signos de necrosis en ninguno de los animales de los grupos estudiados.

#### 6.3.1 Valoración del grado de fibrosis según Escala de Ashcroft

Tal y como se comenta en un apartado anterior, al cuantificar el grado de fibrosis intersticial entre los distintos grupos mediante la puntuación de la Escala de Ashcroft en cada campo se daba la puntuación correspondiente al grado de fibrosis predominante (0, 2, 4, 6 o 8), y en los casos en que era dudoso asignar a uno u otro de esos valores, se puntuaba como el valor intermedio (1, 3, 5 o 7) observamos que:

- 1) Los animales del grupo Control tuvieron una puntuación de 0.
- 2) Los animales del grupo Sham tuvieron una puntuación de  $0,37 \pm 0,07$ .
- 3) Los animales del grupo BLM alcanzaron la puntuación máxima de  $6,55 \pm 0,34$  notablemente mayor y estadísticamente significativa si la comparamos con los Sham ( $p=0,006$ ).
- 4) Los animales del grupo BLM+ADSC-2d tuvieron una puntuación de  $4,63 \pm 0,38$ , que es significativa al compararlo con el grupo BLM ( $p=0,005$ ).
- 5) Los animales del grupo BLM+ADSC-14d tuvieron una puntuación de  $3,77 \pm 0,46$  que es significativa al compararlo con el grupo BLM ( $p=0,005$ ).

A continuación, se representa gráficamente el valor medio de la cuantificación de la fibrosis según la Escala de Ashcroft (Fig. 26):

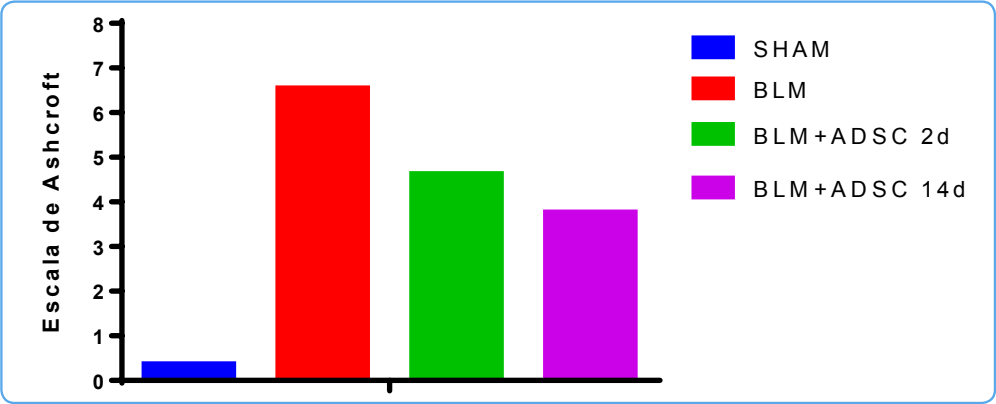


Fig.26 Valor medio de la cuantificación de la fibrosis según Escala de Ashcroft

En la Fig. 27, observamos la evolución de la fibrosis en función del grupo de estudio:

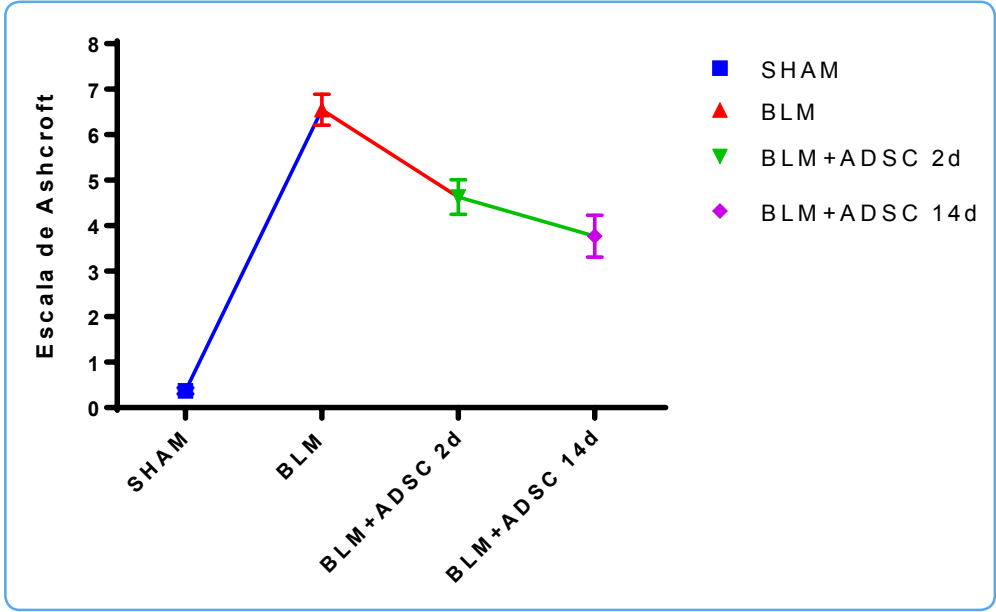


Fig.27 Gráfico de la evolución de la fibrosis según Escala de Ashcroft

6.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El cultivo de las muestras de pulmón de los grupos Control, Sham, BLM y BLM+ADSC-2d y BLM+ADSC-14d fue negativo para bacterias aerobias y anaerobias.

6.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR

6.5.1 GRUPO CONTROL vs RESTO DE GRUPOS

El análisis de la expresión de RNA mensajero de las muestras de pulmón del grupo Control vs Sham, BLM, BLM+ADSC-2d y BLM+ADSC-14d mostró los siguientes resultados para cada uno de los genes analizados.

Tabla 9. Expresión de los genes analizados entre el grupo Control vs Sham

GENES	Control	Sham	P
HSP 27	1 ± 0,09	0,94 ± 0,10	0,522
Vegfa	1 ± 0,05	0,98 ± 0,09	0,631
NFK B	1 ± 0,03	0,97 ± 0,11	0,715
IL6	1 ± 0,22	2,02 ± 0,34	0,006*
Col4	0,99 ± 0,10	1,25 ± 0,19	0,016*
IL1	1 ± 0,14	3,08 ± 0,56	0,006*
Tgfβ1	1 ± 0,12	0,17 ± 0,03	0,006*

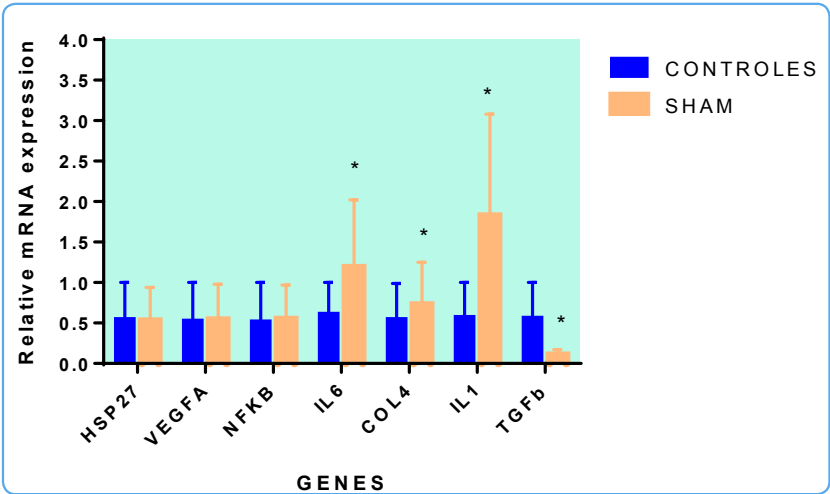


Fig. 28 Expresión de los genes analizados entre Control vs Sham

Tabla 10. Expresión de los genes analizados entre el grupo Control vs BLM

GENES	Control	BLM	p
HSP 27	1 ± 0,09	1,24 ± 0,17	0,045*
Vegfa	1 ± 0,05	1 ± 0,53	0,855
NFK B	1 ± 0,03	1,29 ± 0,12	0,006*
IL6	1 ± 0,22	2,14 ± 0,47	0,006*
Col4	0,99 ± 0,10	2,21 ± 0,33	0,004*
IL1	1 ± 0,14	1,43 ± 0,26	0,010*
Tgfβ1	1 ± 0,12	2,54 ± 0,44	0,004*

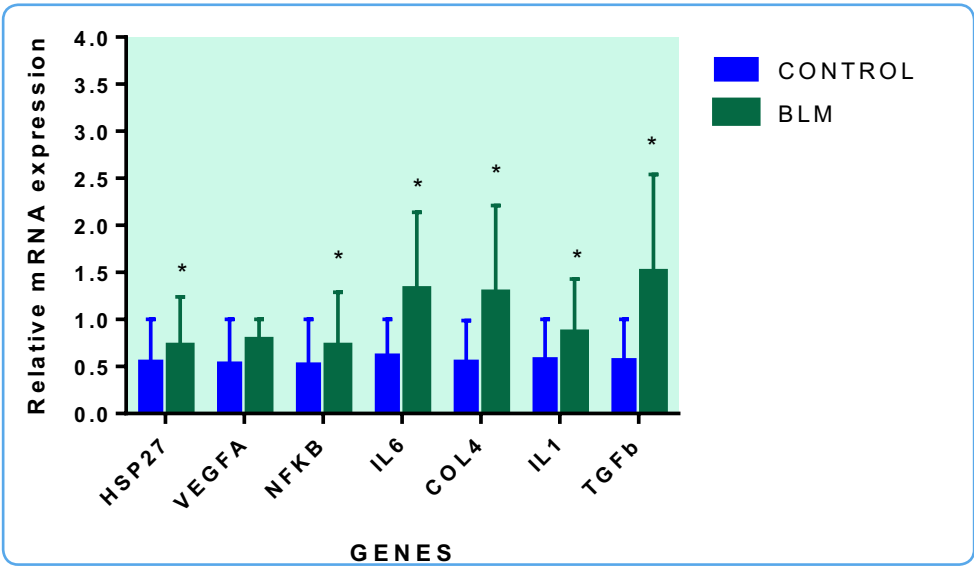


Fig. 29 Expresión de los genes analizados entre Control vs BLM.

Tabla 11. Expresión de los genes analizados entre el grupo Control vs BLM+ADSC-2d

GENES	Control	BLM+ADSC-2d	p
HSP 27	1 ± 0,09	0,87 ± 0,04	0,100
Vegfa	1 ± 0,05	1,23 ± 0,13	0,006*
NFK B	1 ± 0,03	1,68 ± 0,11	0,006*
IL6	1 ± 0,22	1,82 ± 0,11	0,006*
Col4	0,99 ± 0,10	2,05 ± 0,13	0,006*
IL1	1 ± 0,14	1,27 ± 0,09	0,011*
Tgfβ1	1 ± 0,12	2,08 ± 0,15	0,006*

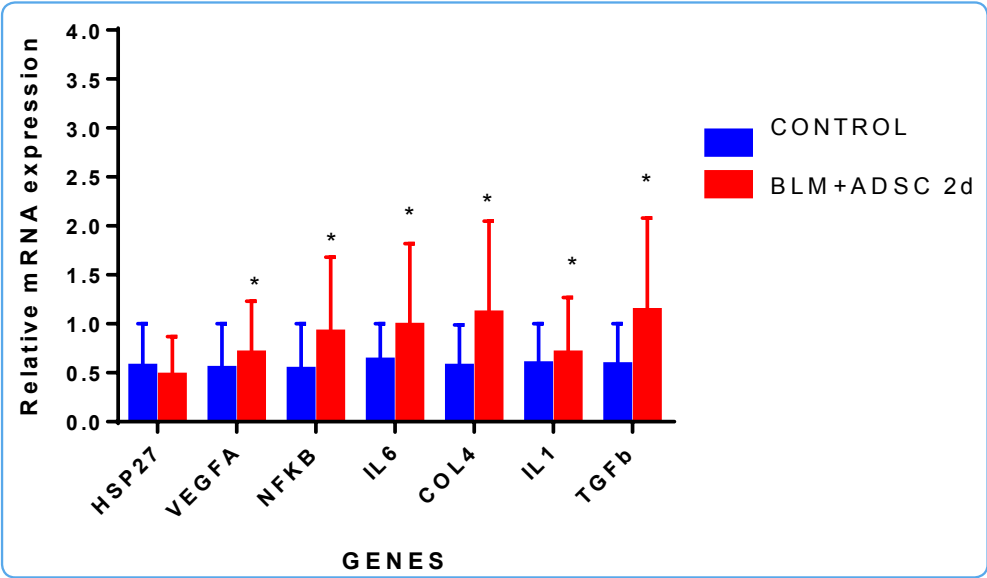


Fig. 30 Expresión de los genes analizados entre el grupo Control vs BLM+ADSC-2d

Tabla 12. Expresión de los genes analizados entre el grupo Control vs BLM+ADSC-14d

GENES	Control	BLM+ADSC-14d	p
HSP 27	1 ± 0,09	0,98 ± 0,15	1,000
Vegfa	1 ± 0,05	0,95 ± 0,41	0,897
NFK B	1 ± 0,03	1,75 ± 0,47	0,003*
IL6	1 ± 0,22	1,25 ± 0,42	0,245
Col4	0,99 ± 0,10	1,25 ± 0,23	0,053
IL1	1 ± 0,14	1,16 ± 0,15	0,053
Tgfβ1	1 ± 0,12	5,83 ± 2,06	0,002*

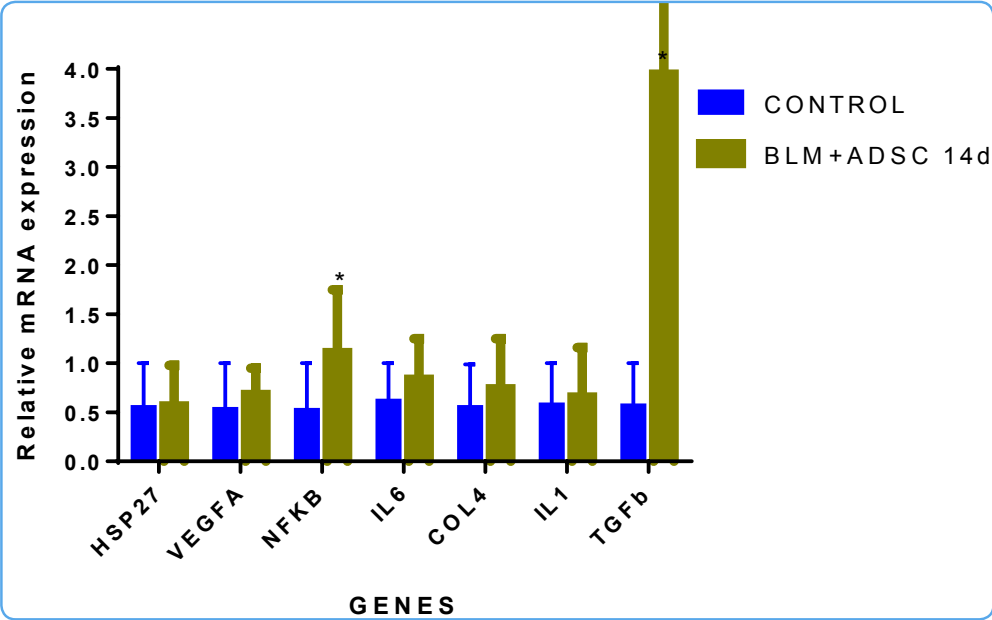


Fig. 31 Expresión de los genes analizados entre el grupo Control vs BLM+ADSC-14d

6.5.2 GRUPO Sham vs RESTO DE GRUPOS

El análisis de la expresión de RNA mensajero de las muestras de pulmón del grupo Sham vs BLM, BLM+ADSC-2d y BLM+ADSC-14d mostró los siguientes resultados para cada uno de los genes analizados.

Tabla 13. Expresión de los genes analizados entre el grupo Sham vs BLM

GENES	Sham	BLM	p
HSP 27	1,06 ± 0,11	1,40 ± 0,20	0,018*
Vegfa	1,03 ± 0,09	1, 05 ± 0,05	0,885
NFK B	1 ± 0,11	1,33 ± 0,13	0,009*
IL6	1,02± 0,17	1,08 ± 0,24	0,602
Col4	1,01 ± 0,15	1,78 ± 0,26	0,004*
IL1	1,06± 0,19	0,49 ± 0,09	0,006*
Tgfβ1	1 ± 0,20	14,44 ± 2,50	0,006*

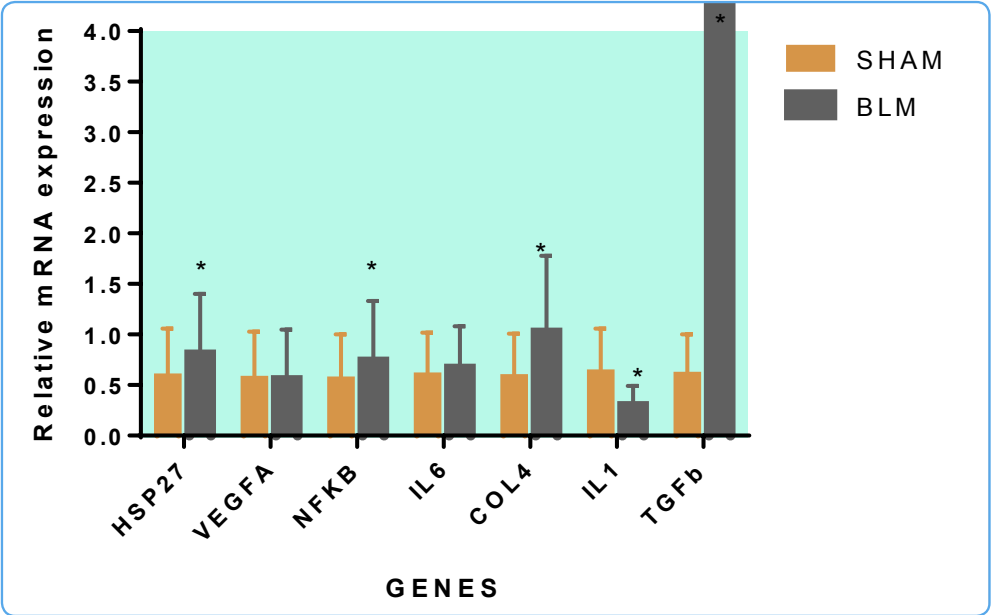


Fig. 32 Expresión de los genes analizados entre el grupo Sham vs BLM



Tabla 14. Expresión de los genes analizados entre el grupo Sham vs BLM+ADSC-2d

GENES	Sham	BLM+ADSC-2d	P
HSP 27	1,06 ± 0,11	0,98±0,04	0,273
Vegfa	1,03 ± 0,09	1,03±0,14	0,011*
NFK B	1 ± 0,11	1,74±0,11	0,009*
IL6	1,02± 0,17	0,92±0,05	0,251
Col4	1,01 ± 0,15	1,65±0,10	0,006*
IL1	1,06± 0,19	0,44±0,03	0,009*
Tgfβ1	1 ± 0,20	11,82±0,86	0,009*

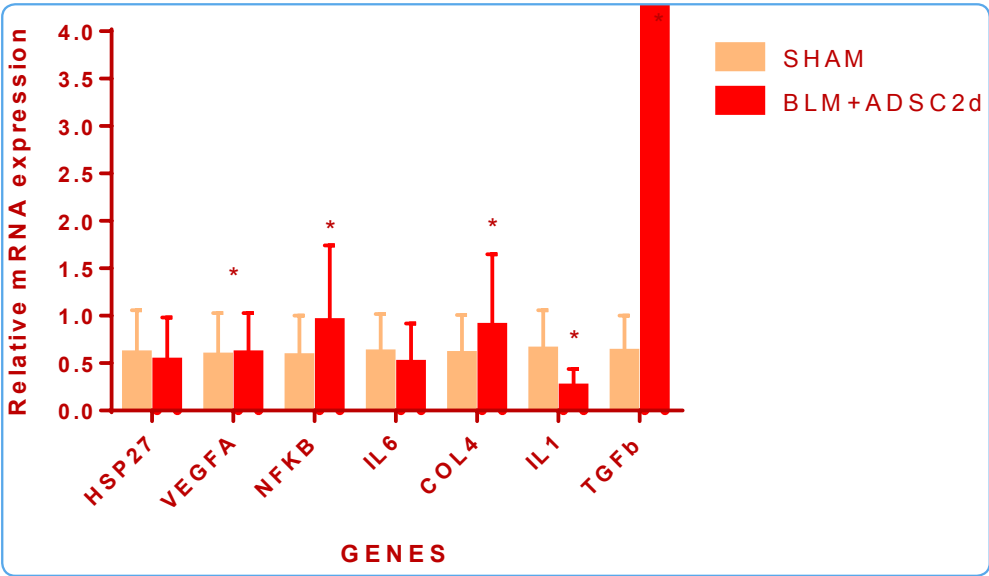


Fig. 33 Expresión de los genes analizados entre el grupo Control vs BLM+ADSC-2d

Tabla 15. Expresión de los genes analizados entre el grupo Sham vs BLM+ADSC-14d

GENES	Sham	BLM+ADSC-14d	P
HSP 27	1,06 ±0,11	1,11 ± 0,16	0,519
Vegfa	1,03 ± 0,09	1 ± 0,43	0,897
NFK B	1 ± 0,11	1,8 ± 0,48	0,005*
IL6	1,02± 0,17	0,63 ± 0,21	0,013*
Col4	1,01 ± 0,15	1 ± 0,18	1,00
IL1	1,06± 0,19	0,40 ± 0,05	0,003*
Tgfβ1	1 ± 0,20	33,13 ± 11,69	0,003*

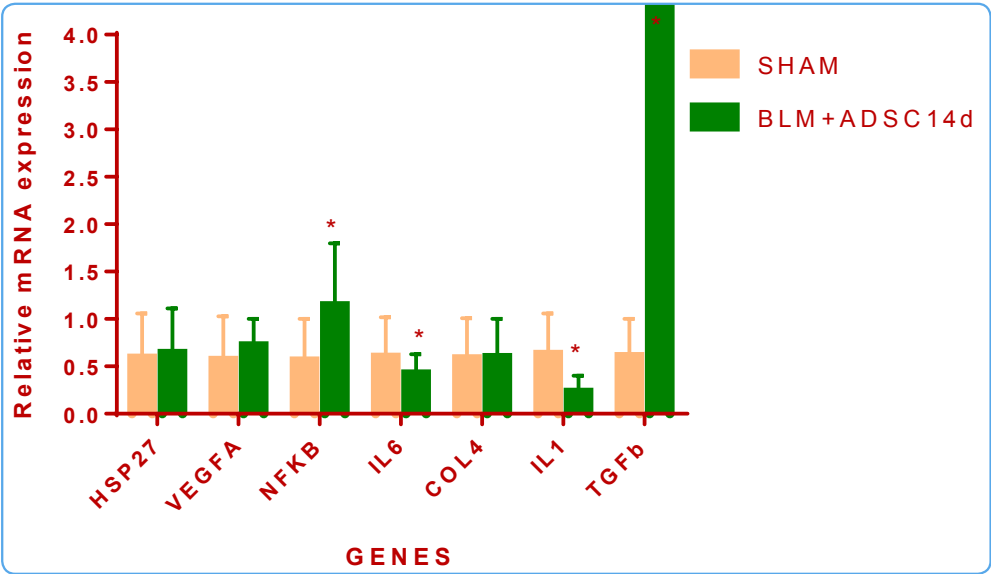


Fig. 34 Expresión de los genes analizados entre el grupo Sham vs BLM+ADSC-14d

6.5.3 GRUPO BLM vs RESTO DE LOS GRUPOS

El análisis de la expresión de RNA mensajero de las muestras de pulmón del grupo BLM vs BLM+ADSC-2d y BLM+ADSC-14d mostró los siguientes resultados para cada uno de los genes analizados.

Tabla 16. Expresión de los genes analizados entre el grupo BLM vs BLM+ADSC-2d

GENES	BLM	BLM+ADSC-2d	P
HSP 27	1 ± 0,14	0,70 ± 0,03	0,009*
Vegfa	1 ± 0,05	1,23 ± 0,13	0,006*
NFK B	1 ± 0,09	1,30 ± 0,08	0,009*
IL6	1 ± 0,22	0,85 ± 0,05	0,175
Col4	1 ± 0,15	0,92 ± 0,06	0,465
IL1	1 ± 0,18	0,88 ± 0,06	0,465
Tgfβ1	1 ± 0,17	0,81 ± 0,05	0,100

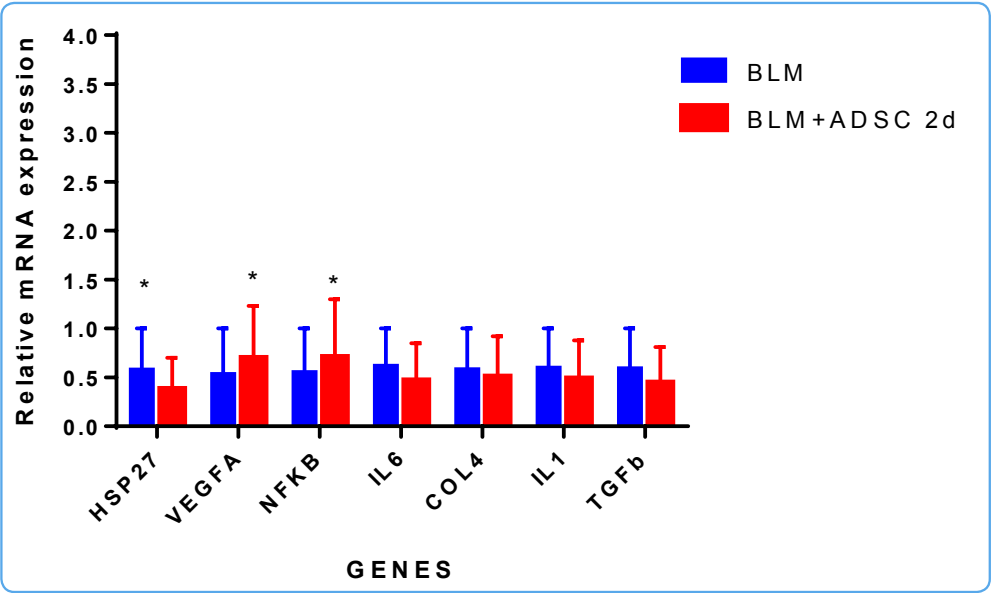


Fig.35 Expresión de los genes analizados entre el grupo BLM vs BLM+ADSC-2d

Tabla 17. Expresión de los genes analizados entre el grupo BLM vs BLM+ADSC-14d

GENES	BLM	BLM+ADSC-14d	P
HSP 27	1 ± 0,14	0,79 ± 0,12	0,028*
Vegfa	1 ± 0,05	0,95 ± 0,41	0,770
NFK B	1 ± 0,09	1,36 ± 0,36	0,040*
IL6	1 ± 0,22	0,58 ± 0,19	0,013*
Col4	1 ± 0,15	0,56 ± 0,10	0,002*
IL1	1 ± 0,18	0,81 ± 0,10	0,121
Tgfβ1	1 ± 0,17	2,29 ± 0,80	0,002*

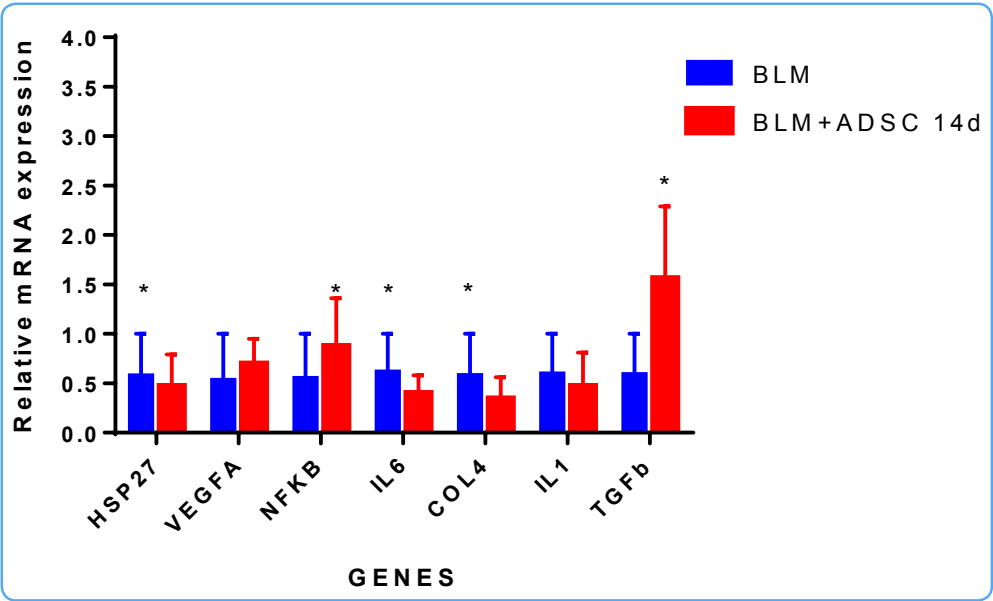


Fig.36 Expresión de los genes analizados entre el grupo BLM vs BLM+ADSC-14d

A continuación, se muestra el análisis de la expresión de RNA mensajero de cada gen de forma individual.

Hsp27

No se observaron diferencias significativas en la expresión de Hsp27 entre el grupo Control y el grupo Sham ( $p=0,522$ ). La expresión Hsp27 en el grupo BLM fue significativamente mayor ( $p= 0,018$ ) que en el grupo Sham, mientras que su expresión en el grupo BLM +ADSC-2d mostró una disminución significativa con respecto al grupo de BLM ( $p=0,009$ ) pero sin diferencias significativas con respecto al grupo Sham ( $p=0,100$ ). Su expresión en el grupo BLM+ADSC-14d resultó significativamente menor que el grupo BLM ( $p=0,028$ ) pero sin diferencias significativas con el grupo Sham ( $p =0,519$ ).

Tabla 18. Expresión individual del gen HSP 27

GEN	HSP 27
Control	1 ± 0,09
Sham	1,06 ± 0,11
BLM	1 ± 0,14
BLM+ADSC-2d	0,70 ± 0,03
BLM+ADSC-14d	0,79 ± 0,12

$p < 0.05$

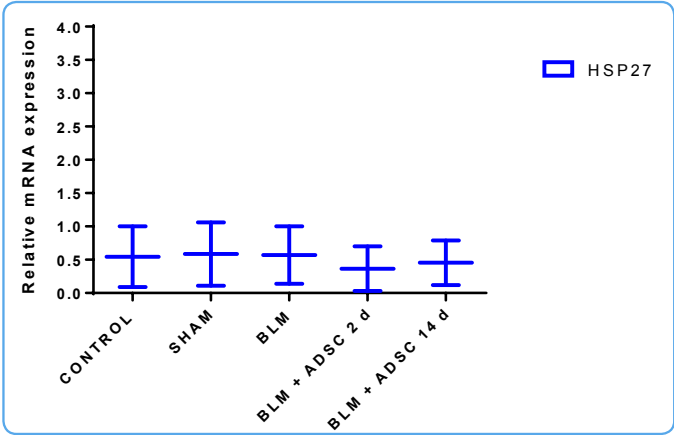


FIG.37 Expresión individual del gen Hsp27

Vegfa

No se observaron diferencias significativas en la expresión de Vegfa entre el grupo Control y el grupo Sham ( $p=0,631$ ). No hubo diferencias significativas de la expresión de Vegfa entre el grupo BLM y el grupo Sham ( $p=0,855$ ). Se observó un incremento significativo en su expresión en el grupo BLM+ADSC-2d con respecto al grupo Sham ( $p=0,011$ ) y al grupo de BLM ( $p=0,006$ ). Su expresión en el grupo BLM+ADSC-14d no mostró diferencias significativas con respecto al grupo BLM ( $p=0,770$ ) y Sham ( $p=0,897$ ).

Tabla 19. Expresión individual del gen Vegfa

GEN	Vegfa
Control	1 ± 0,05
Sham	1,03 ± 0,09
BLM	1 ± 0,05
BLM+ADSC-2d	1,23 ± 0,13
BLM+ADSC-14d	0,95 ± 0,41

$p < 0.05$

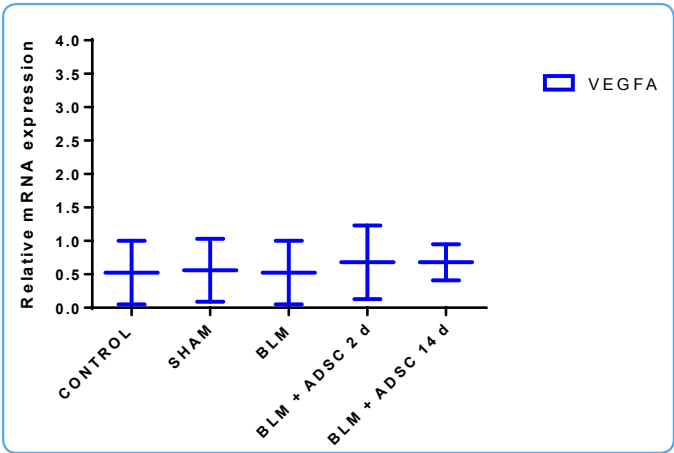


FIG.38 Expresión individual del gen Vegfa

NFkB

No se observaron diferencias significativas en la expresión de NFkB entre el grupo Control y el grupo Sham ( $p=0,715$ ). La expresión de NFkB en el grupo BLM fue significativamente mayor ( $p = 0,009$ ) que en el grupo Sham. La expresión en el grupo BLM+ADSC-2d fue significativamente mayor con respecto al Sham ( $p=0,009$ ) y BLM ( $p=0,009$ ). Su expresión en el grupo BLM+ADSC-14d fue significativamente mayor con respecto al Sham ( $p=0,005$ ) y al grupo BLM ( $p=0,040$ ).

Tabla 20. Expresión individual del gen Nfkb

GEN	Nfkb
Control	1 ± 0,03
Sham	1 ± 0,11
BLM	1 ± 0,09
BLM+ADSC-2d	1,30 ± 0,08
BLM+ADSC-14d	1,36 ± 0,36

$p < 0.05$

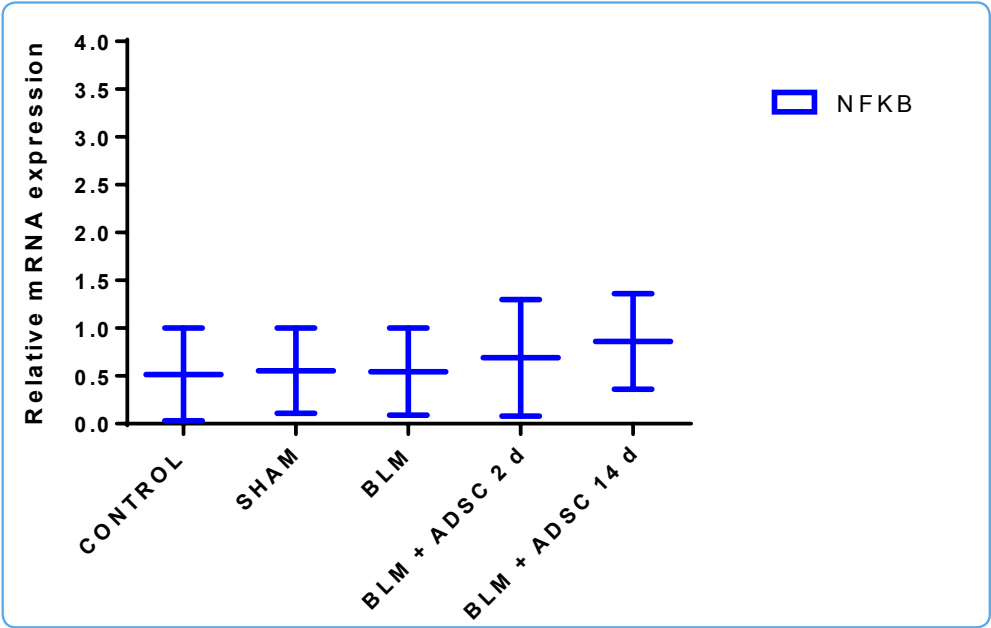


FIG.39 Expresión individual del gen Nfkb

IL6

Se observó un incremento significativo en la expresión de IL6 entre el grupo Control y el Sham ( $p=0,004$ ) así como en el grupo de BLM ( $p=0,006$ ) con respecto al Control, aunque sin cambios significativos con respecto al Sham ( $p=0,602$ ). Su expresión en el grupo BLM+ADSC-2d no mostró diferencias significativas con respecto al grupo BLM ( $p=0,175$ ) y Sham ( $p=0,251$ ). Su expresión en el grupo BLM+ADSC-14d no mostró diferencias significativas con respecto al grupo Control, fue significativamente menor con respecto al grupo Sham ( $p=0,013$ ) y significativamente menor con respecto al grupo BLM ( $p=0,013$ ).

Tabla 21. Expresión individual del gen IL 6

GEN	IL 6
Control	1 ± 0,22
Sham	1,02± 0,17
BLM	1 ± 0,22
BLM+ADSC-2d	0,85 ± 0,05
BLM+ADSC-14d	0,58 ± 0,19

$p < 0.05$

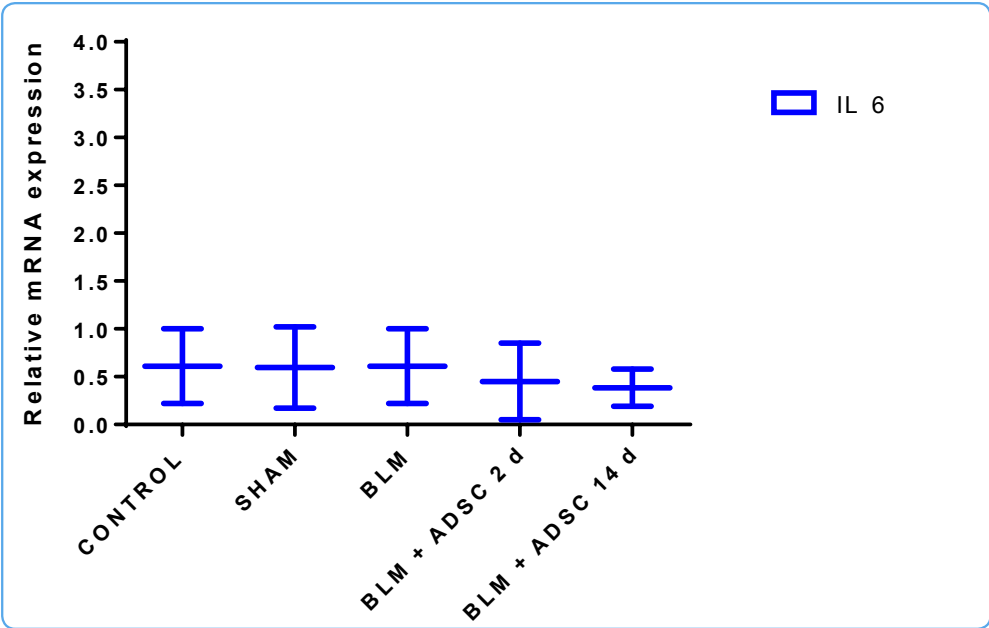


FIG.40 Expresión individual del gen IL 6



Col4

Se observó un incremento significativo en la expresión de Col4 entre el grupo Sham y el Control ( $p=0,016$ ) así como en el grupo BLM con respecto al grupo Sham ( $p=0,004$ ) y al grupo Control ( $p=0,006$ ). Su expresión en el grupo BLM+ADSC-2d no mostró diferencias significativas con el grupo BLM ( $p=0,465$ ) pero fue significativamente mayor que en el grupo Sham ( $p=0,006$ ) y Control ( $p=0,006$ ). Su expresión en el grupo BLM+ADSC-14d fue significativamente menor con respecto al grupo BLM ( $p=0,002$ ) pero no mostró diferencias significativas con respecto al grupo Sham ( $p=1,00$ ) y al Control ( $p=0,053$ ).

Tabla 22. Expresión individual del gen COL 4

GEN	COL 4
Control	0,99 ± 0,10
Sham	1,01 ± 0,15
BLM	1 ± 0,15
BLM+ADSC-2d	0,92 ± 0,06
BLM+ADSC-14d	0,56 ± 0,10

$p < 0.05$

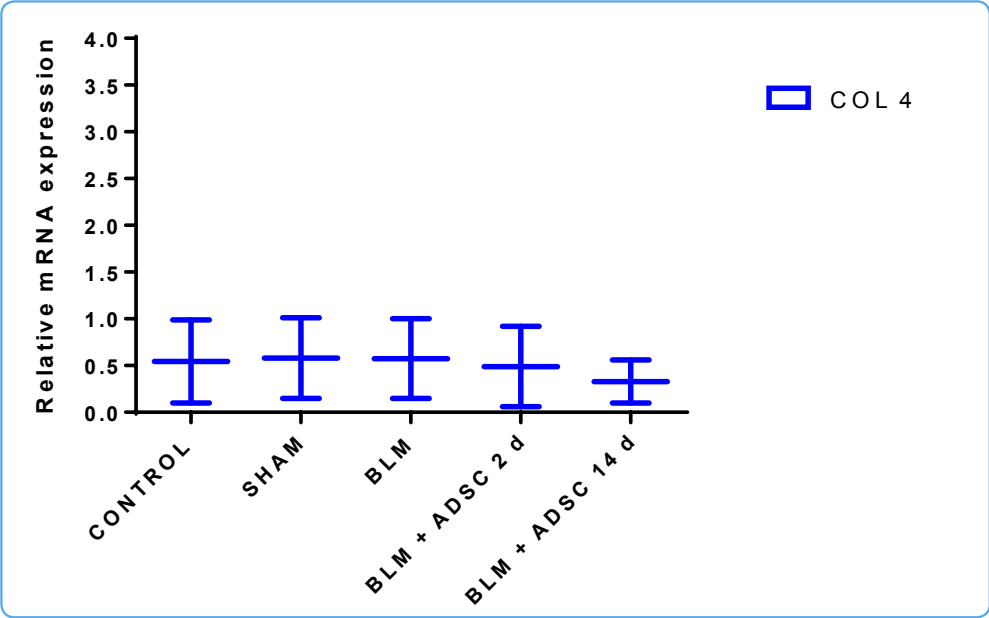


FIG.41 Expresión individual del gen COL 4

IL1

Se observó un incremento significativo en la expresión de IL1 entre el grupo Sham y el grupo Control ( $p=0,006$ ). La expresión de IL1 en el grupo BLM fue significativamente mayor que en el grupo Control ( $p=0,010$ ) y menor que en el grupo Sham ( $p=0,006$ ). La expresión en el grupo BLM+ADSC-2d no mostró cambios significativos con respecto al grupo BLM ( $p=0,465$ ) pero fue significativamente mayor con respecto al grupo Control ( $p=0,011$ ) y menor con respecto al grupo Sham ( $p=0,009$ ). Su expresión en el grupo BLM+ADSC-14d no mostró cambios significativos con respecto al grupo BLM ( $p=0,053$ ), y grupo Control ( $p=0,053$ ) pero mostró una disminución significativa con respecto al Sham ( $p=0,003$ ).

Tabla 23. Expresión individual del gen IL 1

GEN	IL 1
Control	1 ± 0,14
Sham	1,06± 0,19
BLM	1 ± 0,18
BLM+ADSC-2d	0,88 ± 0,06
BLM+ADSC-14d	0,81 ± 0,10

$p < 0.05$

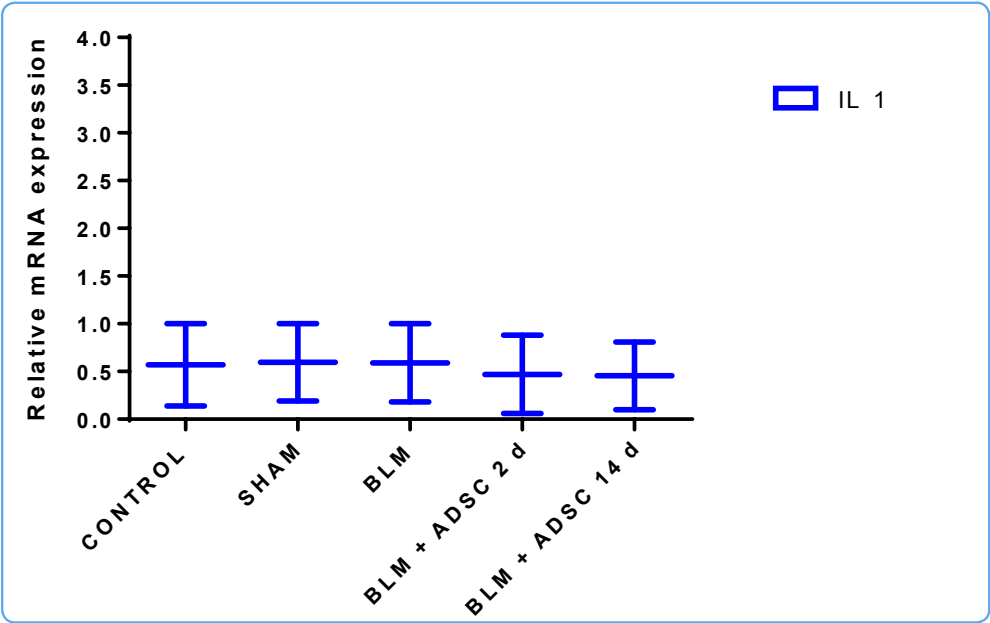


FIG.42 Expresión individual del gen IL 1

Tgfβ1

Se observó una disminución significativa en la expresión de Tgfβ1 entre el grupo Control y el Sham (p=0,004). La expresión de Tgfβ1 en el grupo BLM fue significativamente mayor que en el grupo Control (p=0,004) y Sham (p=0,006). La expresión en el grupo BLM+ADSC-2d no mostró diferencias significativas con el grupo BLM (p=0,1) pero fue significativamente mayor con respecto al grupo Control (p=0,006) y Sham (p=0,009). Su expresión en el grupo BLM+ADSC-14d fue significativamente mayor con respecto al grupo BLM (p=0,002), al grupo Control (p=0,002) y Sham (p=0,003).

Tabla 24. Expresión individual del gen Tgfβ1

GEN	Tgfβ1
Control	1 ± 0,12
Sham	1 ± 0,20
BLM	1 ± 0,17
BLM+ADSC-2d	0,81 ± 0,05
BLM+ADSC-14d	2,29 ± 0,80

p< 0.05

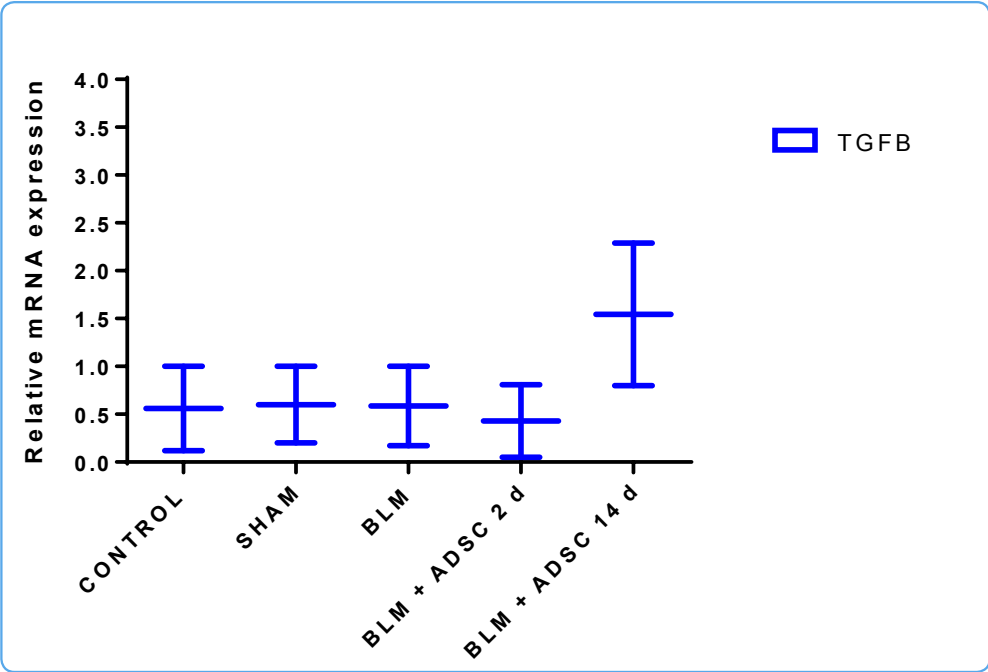


FIG.43 Expresión individual del gen Tgfβ1





---

---

# VII

## DISCUSIÓN



Las EPID son un grupo heterogéneo de enfermedades que presentan manifestaciones clínicas, anatomopatológicas, radiológicas y funcionales similares que afectan a las estructuras alveolo-intersticiales con un componente inflamatorio variable y, según el caso, con la participación de las vías respiratorias de pequeño calibre y de la vascularización pulmonar<sup>1</sup>.

La FPI es la más frecuente y agresiva de éstas enfermedades y la de peor pronóstico, incluso peor que algunos tipos de cáncer, que sólo engloba las patologías que presentan una forma de neumopatías con fibrosis intersticial crónica limitada al pulmón y asociada a un patrón histopatológico de neumonía intersticial usual en el que se observan áreas de fibrosis pulmonar que coexisten con focos de proliferación fibroblástica<sup>2</sup>.

En la actualidad no existe un tratamiento médico eficaz que pueda frenar o cambiar el curso evolutivo de la misma y evitar su fatal progresión afectando de forma considerable la función respiratoria y la calidad y cantidad de vida de los pacientes<sup>10</sup>.

En los últimos años se han producido importantes avances en el conocimiento de su fisiopatología, pasando del concepto de enfermedad inflamatoria a ser considerada actualmente una enfermedad principalmente fibrogénica, de forma que se ha llegado a considerar un problema de “homeostasis tisular alterada” y una “activación aberrante” de las células epiteliales alveolares y de los fibroblastos con el consiguiente depósito de colágeno que se agrava con la edad. Sin embargo, son muchas las dudas que existen aún sobre los mecanismos que generan la fibrogénesis incontrolada de la FPI<sup>53</sup>.

Es por ello que se demanda un esfuerzo de investigación traslacional que ayude a mejorar los conocimientos básicos de la enfermedad, debido a la necesidad de comprender su patogénesis en más profundidad y encontrar tratamientos eficaces. En este sentido, este trabajo de tesis doctoral recoge varias de las recomendaciones para la investigación en FPI recientemente propuestas en un workshop del *National Heart Lung and Blood Institute-NHLBI*<sup>67</sup>, como son:

- 1) El estudio de nuevos tratamientos durante las fases de fibrogénesis y de inicio de la fase inflamatoria,
- 2) El estudio de los cambios en la matriz extracelular y la histología de la arquitectura pulmonar,
- 3) La caracterización y explotación de las vías endógenas que inhiban la inflamación y la fibrosis,
- 4) La realización de estudios genéticos para identificar nuevas dianas que nos permitan influir en el desarrollo de la FPI.



Los modelos experimentales de enfermedad son una gran herramienta de trabajo para la investigación traslacional, siempre que se realicen bajo la estricta regulación de la normativas internacionales de uso de animales de experimentación y con el máximo cumplimiento de las conocidas 3 R, descrita por los biólogos ingleses, Russell y Burch, en su libro *“The Principle of Humane Experimental Technique”* en la década de los 60 y que hacen referencia a los métodos de reemplazo, reducción y refinamiento. Las *alternativas de reemplazo* aluden a métodos que eviten o sustituyan el uso de animales que incluyen tanto los reemplazos absolutos (es decir, sustituir animales por modelos informáticos), como los reemplazos relativos (es decir, sustituir vertebrados, por animales con una menor percepción del dolor, como algunos invertebrados). Las *alternativas de reducción* aluden a cualquier estrategia que tenga como resultado el uso de un menor número de animales para obtener datos suficientes que respondan a la cuestión investigada, o la maximización de la información obtenida por animal, para así limitar o evitar potencialmente el uso posterior de otros animales, sin comprometer el bienestar animal. Las *alternativas de refinamiento* hacen mención a la modificación de la cría de animales o de los procedimientos para minimizar el dolor y la angustia, así como para mejorar el bienestar de los animales utilizados en la ciencia desde su nacimiento hasta su muerte<sup>71</sup>. Así, siguiendo el segundo principio de “alternativas de reducción”, en el grupo control de nuestro proyecto en lugar de emplear 6 pulmones de 6 animales distintos, decidimos analizar por separado pulmones derechos e izquierdos de 3 animales (6 pulmones igualmente) minimizando el número de animales a sacrificar.

El modelo de desarrollo de fibrosis pulmonar en ratas mediante la instilación traqueal de BLM utilizado en esta tesis doctoral, ha demostrado ser un buen modelo experimental dada:

- 1) La aparición de lesiones pulmonares similares a las observadas en los enfermos con FPI en un grado significativamente mayor que el observado en el grupo Sham,
- 2) La pérdida de peso de los animales en relación con la instauración de la enfermedad,
- 3) La ausencia de mortalidad entre los animales de los grupos tratados y la supervivencia de los mismos hasta los 28 días, cuando la mayoría de los estudios experimentales sacrifican los animales a los 14 días<sup>94</sup>.
- 4) La expresión significativa de los genes relacionados con la fibrosis pulmonar como son Hsp27, Nfkb, IL6, IL1, Tgfβ1 y Col4.

Además, dicho modelo cumple con las 3 R previamente descritas en cuanto que no existen alternativas de reemplazo y que se han extremado las alternativas de reducción del número de animales y las técnicas de refinamiento durante la realización de los procedimientos y durante el sacrificio de los animales.

Por todo ello, podemos dar por cumplido el primer objetivo de nuestro trabajo en cuanto a “desarrollar un modelo experimental válido en ratas de FP inducida con BLM”.

En los últimos años, hemos sido testigos de la gran cantidad de datos experimentales relacionados con el aislamiento, diferenciación y aplicación de SC como una opción de tratamiento en modelos animales de fibrosis e inflamación. Sin embargo, ha habido escasos estudios experimentales y clínicos en relación con la patología respiratoria en general y con la fibrosis pulmonar en particular<sup>72</sup>.

Las SC representan una nueva y prometedora estrategia terapéutica con innumerables aplicaciones clínicas en las enfermedades pulmonares crónicas que implica la reparación de tejidos y su regeneración. *Sang Hoon Lee et al.*<sup>73</sup>, demostraron en un modelo experimental de FP inducida por BLM con 40 ratas macho que la administración intraperitoneal de ADSC disminuyó el proceso inflamatorio, los fenómenos fibróticos, la apoptosis y el aumento de Tgfβ1.

Una observación prometedora para los futuros ensayos clínicos es el adecuado nivel de seguridad de las SC que es el aspecto esencial que apoyaría el uso de las SC en la FPI aunque quedan aún aspectos por aclarar sobre todo en lo que conciernen al momento más apropiado para trasplantar las SC, la dosis ideal y la mejor o mejores vías de administración desde el punto de vista traslacional. En el estudio de *Hare et al.*<sup>95</sup> evaluaron la seguridad y eficacia de hMSC derivadas de médula ósea alogénica administradas en pacientes que experimentan un primer infarto agudo de miocardio, aunque hubo toxicidad comparado al placebo, la administración de SC fue bien tolerada.

A pesar de ser un buen modelo experimental, desde un punto de vista traslacional, el modelo de FP inducido por BLM podría ser mejorado a la hora de mantener de forma crónica el proceso de FP para que se asemeje de forma aún más realista a lo que ocurre en la FPI, de forma que nos permita ensayar diferentes alternativas terapéuticas de forma más prolongada, modelo en el que ya estamos trabajando. Una posible limitación de los actuales modelos experimentales de estudio de la FP es la utilización de ratones o ratas jóvenes de menos de 3 meses, como ocurre en la mayoría de los modelos que se han utilizado, ya que el envejecimiento de pulmón es uno de los principales factores de riesgo de la FPI. *Tashiro et al.*<sup>94</sup> describieron que las lesiones pulmonares se pueden resolver espontáneamente en

los animales jóvenes en un estudio de FP inducida con BLM y usando ADSC por vía iv. Se ha sugerido que ésta variable debe ser tenida en cuenta en la evaluación de los resultados preclínicos y en la traslación de los mismos a los ensayos clínicos. Sin embargo, en nuestro estudio utilizamos ratas jóvenes de 3-4 meses de edad como donantes de células madres y como receptores del trasplante, no pudimos comprobar la regresión espontánea de las lesiones pulmonares fibróticas inducidas por BLM, ya que todos los animales del grupo de BLM presentaron niveles altos en la Escala de Achroft, aunque bien es verdad que los estudio de *Tashiro et al.*<sup>94</sup> está realizados en ratones y no en ratas donde la variabilidad genética entre especies puede haber influido en los resultados.

*Tashiro et al.*<sup>94</sup>, utilizaron dosis de  $5 \times 10^6$  de ADSC iv. sin embargo, nosotros conseguimos en nuestro estudio excelentes resultados con dosis muy inferiores por vía traqueal, siendo el primer estudio de FP experimental que se describe en este sentido. La necesidad de una dosis mayor de ADSC por vía sanguínea puede tener relación con el bloqueo de SC en los capilares pulmonares de forma que éstas no pueden acceder al espacio alveolar<sup>101</sup>, hecho que se consigue directamente con nuestro modelo de trasplante trastraqueal de ADSC.

Por otro lado, el mismo grupo describe una mortalidad del 4% con la instilación traqueal de la misma dosis que utilizamos en nuestro estudio, 2,5 mg/kg. Es probable que esta mortalidad que describen pueda tener relación no sólo con la elevada edad de los animales, sino también con la forma de administración de la BLM, dado el hecho de que nuestros valores de la Escala de Ashcroft fueron más de 2 puntos superior al de este estudio.

Las terapias basadas en células madre han mostrado un gran potencial para tratar a pacientes con enfermedades pulmonares. En una reciente revisión de *M. Ghadiri et al.*<sup>74</sup> sobre diferentes estudios validan que la administración de las células madre en un pulmón lesionado puede ser considerado como un método terapéutico para reparar y reemplazar el tejido pulmonar dañado y que las células trasplantadas tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse en las células alveolares, y se han propuesto como una estrategia terapéutica para el tratamiento de FPI. El mismo artículo señala que una de las vías de futuro de la investigación en FPI es la combinación de terapia con células madre y terapia génica, como hemos comentado anteriormente en el capítulo II de esta Tesis y como podría ser el modelo de investigación que ha seguido esta Tesis doctoral.

Por otro lado, se sabe que los procesos de óxido-reducción intracelular y las defensas frente a los mismos están presentes y regulados genéticamente en la FP, y que se inician desde las primeras fases de la lesión. De esta forma, en el pulmón con lesiones fibróticas se produce una situación de estrés oxidativo celular crónico que es responsable del daño tisular irreversible<sup>53</sup>.

En nuestro estudio, la administración de ADSC por vía transtraqueal no utilizado antes en modelos experimentales de FP, ha paliado de forma significativa el daño pulmonar subsecuente asociado a la misma. La disminución significativa de las lesiones pulmonares y del grado de fibrosis en el grupo tratado con ADSC tanto a los 2 como a los 14 días sugiere que las ADSC son capaces de modular los procesos inflamatorios y el estrés oxidativo inicial que conducen a la aparición de la FP y a regenerar el tejido cuando la fibrosis está instaurada.

Estos hechos adquieren un valor adicional teniendo en cuenta que: 1) el análisis histológico se realizó de forma ciega respecto al grupo de procedencia de las muestras y, 2) los resultados negativos del análisis microbiológico en todas las muestras descartan que la gradación del proceso de fibrosis observado entre los distintos grupos pudiera haberse debido a infecciones intercurrentes.

Ello, nos permite dar por cumplido el segundo objetivo de nuestro trabajo en cuanto al hecho de *“valorar la capacidad de proliferación, diferenciación y reparación tisular de las ADSC en el modelo de FP”*.

Por otro lado, la susceptibilidad pulmonar a sufrir FPI está determinada por una combinación variable de genes, polimorfismos y alteraciones transcripcionales y cambios epigenéticos (metilación, modificación de histonas, regulación de microARN, etc) que parecen ser los responsables del desarrollo específico de la FPI y de la expresión de genes relacionados con la inflamación y la fibrosis.

Es interesante destacar que los últimos avances en el conocimiento de la genética humana han establecido una relación clara entre la disfunción telomérica y diferentes enfermedades degenerativas. El descubrimiento de la mutación en el gen DKC1 como la base genética de una rara enfermedad conocida como Disqueratosis Congénita, estableció las bases de futuras investigaciones en el campo de los telómeros<sup>75</sup>.

El gen DKC1 codifica para la disquerina, proteína esencial para la estabilidad del componente TR y de la función de la telomerasa. De este modo, las mutaciones en TERT, TR, DKC1 y/o shelterina causan pérdida de función de la enzima y aceleran el acortamiento telomérico, que normalmente ocurre con la edad, provocando un envejecimiento prematuro<sup>75</sup>. Las mutaciones en TERT y TR son las más frecuentes y se manifiestan con un patrón de herencia autosómica dominante<sup>76</sup>. De este modo, el defecto de la longitud telomérica está presente en las células germinales dando lugar a diferentes presentaciones clínicas. La agrupación de las mismas bajo el espectro de un mismo síndrome (Síndromes Teloméricos)<sup>77</sup> puede ser crucial en la toma de decisiones clínicas, puesto que diversos

órganos pueden verse afectados incluso cuando predominan las manifestaciones de una única enfermedad. Recientes investigaciones en modelos animales modificados genéticamente han concluido que los sujetos con deleciones de TERT y/o TR únicamente expresan fenotipo cuando la longitud telomérica está afectada<sup>76</sup>. A través de un mecanismo de anticipación genética, el acortamiento telomérico provoca el empeoramiento fenotípico en generaciones consecutivas mediante la acumulación de telómeros disfuncionantes. Los portadores de la mutación que son fumadores mueren una media de 10 años antes que los portadores que no son fumadores<sup>78</sup>. Por tanto, la ausencia de telomerasa no es suficiente para causar enfermedad degenerativa. Hay evidencia de que la longitud telomérica es heredable siendo, por tanto, el principal determinante genético en la severidad del fenotipo.

Los tejidos con alta tasa de recambio son particularmente sensibles a la longitud telomérica. Por este motivo, las enfermedades asociadas a telómeros se manifiestan prematuramente en la medula ósea, debido al agotamiento de las SC. En tejidos con baja tasa de recambio, como el pulmón, la disfunción telomérica causa fenotipos prominentes observando una alta penetrancia de afectación pulmonar.

No obstante, el defecto telomérico por sí solo no es suficiente para inducir enfermedad pulmonar espontánea. Un segundo agravio es necesario para dañar adicionalmente los telómeros disfuncionantes de las células epiteliales pulmonares, que debido a su baja tasa de recambio presentan un agotamiento replicativo retardado. Por este motivo, la afectación pulmonar representa un fenotipo atenuado comúnmente expresado después de la mediana edad. Para que se desarrolle FPI es necesaria la participación de factores exógenos o ambientales sobre un terreno genéticamente predisuesto.

Hay que tener en cuenta que el pulmón fibrótico se asemeja marcadamente a un órgano “supercicatrizado”, sugiriendo que la fibrosis podría visualizarse como un proceso de reparación “excesivo” probablemente como resultado de la inflamación continuada. De hecho, un número considerable de estudios ha examinado la interacción entre células inflamatorias y células del parénquima pulmonar, principalmente fibroblastos, ilustrando la relevancia de estas interacciones en la patogénesis de la fibrosis pulmonar. Así, el incremento en el depósito de fibras colágenas en el intersticio pulmonar que caracteriza a esta enfermedad, ocurriría como resultado de la activación de los fibroblastos por moléculas liberadas por varias células inflamatorias (citoquinas), particularmente por macrófagos alveolares y linfocitos<sup>79</sup>.

La FPI puede ser el resultado de un envejecimiento pulmonar acelerado, tal y como hemos comentado previamente. Se sabe que entre el 20-35% de los pacientes presentan acortamiento telomérico y el 50-70% con Fibrosis Pulmonar familiar (FPF) se asocian a

este defecto y aún peor pronóstico y mayor número de problemas asociados al trasplante. Como se relaciona estas alteraciones teloméricas con la expresión de genes proinflamatorios y la aparición de lesiones fibróticas está aún por resolver. Futuras investigaciones en este campo harán posible el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, protocolos de manejo y consejo genético para la atención personalizada de estos pacientes.

En este sentido, los resultados observados en los cambios de expresión génica de los genes relacionados con la FPI como el aumento de su expresión el grupo de BLM y la significativa reducción en el grupo tratado con ADSC, nos permiten dar por cumplido el tercer objetivo de nuestro trabajo de *“Analizar la expresión génica en búsqueda de biomarcadores de fibrosis pulmonar y monitorizar la respuesta al tratamiento con ADSC”*

Hay que tener en cuenta que las MSC expresan diferentes tipos de mediadores celulares como Tgf $\beta$ 1, Vegf, Pdgf, Egf y Fgf con efectos celulares paracrinos durante los procesos de reparación y regeneración tisular, que actúan como una unidad funcional cuyo objetivo final es la restauración del tejido<sup>96</sup>. Las proteínas albergadas en las células de los seres vivos se ven sometidas constantemente a la acción de numerosos agentes estresantes lo que les produce múltiples alteraciones, algunas de las cuales pueden ser incompatibles con la vida. Para luchar contra ellos, las células se hallan dotadas de una serie de mecanismos protectores entre los que se encuentran las proteínas del shock térmico, también conocidas como proteínas del estrés o “Heat shock proteins”. Su cometido fundamental consiste en proteger a las proteínas estructurales contra los efectos que el estrés origina sobre su síntesis y funcionalismo, incluida la muerte celular programada o apoptosis. En este sentido, **Hsp27** es una pequeña proteína miembro de esta familia capaz de formar largas cadenas que actúan como chaperonas involucradas en el plegado y la renaturalización de las proteínas y en la degradación de aquellas que se han desnaturalizado de manera irreversible. Entre sus acciones más destacadas se encuentran: 1) su capacidad para modular las ERO (especies reactivas del oxígeno) y estimular la expresión de enzimas antioxidantes actuando entonces como un citoprotector, 2) inhibir la apoptosis y proteger a los filamentos de actina de la fragmentación, así como, 3) tener un papel esencial en la diferenciación de los tejidos, en la termotolerancia y en la citoprotección bajo condiciones de estrés y oxidación. Sin embargo, a pesar de sus propiedades protectoras *Wettstein G et al.*<sup>80</sup> describieron que esta proteína está directamente relacionada con la FPI y que su inhibición bloquea el desarrollo de la FP. De hecho, otros autores como *Vidyasagar*<sup>81</sup>, la señalan como un biomarcador de enfermedad y una potencial diana terapéutica.

Una posible explicación a todos estos hallazgos podría ser la existencia de un efecto diferencial de Hsp27, con mayor acción o sobre expresión en fibroblastos y miofibroblastos (disminuyendo su apoptosis y favoreciendo su perpetuación más allá de acabado el

proceso de reparación) y con un menor efecto o sobreexpresión sobre las CEA (y por tanto con menor acción protectora sobre las mismas). En nuestro estudio, hemos podido observar que la Hsp27 se expresa de forma significativa en el grupo de BLM y que el tratamiento con ADSC disminuye su expresión hasta niveles normales lo que indica que: o bien esta proteína efectivamente está directamente implicada en el desarrollo de la FP y que el efecto protector de las ADSC reduce su expresión contribuyendo a la disminución del grado de fibrosis pulmonar, o bien Hsp27 se expresa ante el daño pulmonar inducido por la fibrosis en un intento por proteger a las células del daño oxidativo, de forma que su expresión disminuiría con las ADSC al disminuir éstas el estrés oxidativo, los fenómenos inflamatorios y la lesión pulmonar. Esta segunda hipótesis, se ve apoyada por dos trabajos de nuestro grupo de investigación. El primero corresponde a un estudio con DNA microarrays del rechazo crónico en el trasplante pulmonar<sup>82</sup> en el que se concluyó que Hsp27 protege el citoesqueleto del rechazo crónico e inhibe la apoptosis. El segundo estudio, sobre los efectos del ozono (O3) sobre el rechazo crónico del trasplante pulmonar, fue financiado por una beca del ISCIII (PI 10/01485) y motivo de una Tesis Doctoral Europea cuyos resultados están pendientes de publicación; en él se observó que en los animales tratados con O3 la expresión de Hsp27 estaba también disminuida, como muestra del efecto antioxidante con carácter reparador sobre la sobreexpresión de estas proteínas. Por estos motivos, pensamos que para averiguar cuál es el papel real de Hsp27 en la FPI se requiere de más estudios, en los que nuestro grupo está en la actualidad trabajando.

**Vegf** es una proteína señalizadora implicada en la vasculogénesis (formación *de novo* del sistema circulatorio embrionario) y en la angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes). Vegf tiene acciones sobre las células endoteliales, estimulando su división y migración, pero también tiene efectos sobre otros tipos celulares ya que estimula la migración de monocitos/macrófagos, neuronas, células epiteliales renales, células tumorales y células madre hematopoyéticas<sup>97</sup>. Es vasodilatador por estimulación de la liberación de óxido de nitrógeno, incrementa la permeabilidad vascular, la actividad de la metano monooxigenasa, la actividad de la integrina  $\alpha\text{v}\beta 3$ , la creación de la luz y de las fenestraciones de los vasos<sup>83</sup>. En nuestro estudio, el trasplante de ADSC-2d incrementó de forma significativa la expresión de Vegf, en probable relación con: 1) el proceso de regeneración tisular y la diferenciación de las ADSC, 2) el estímulo migratorio de las monocitos y macrófagos hacia los focos inflamatorios donde realizan sus acciones de depuración de restos celulares en fases precoces de la enfermedad, 3) la estimulación de la neovascularización y la diferenciación de las ADSC hacia células endoteliales dependientes de VEGF cuando la vía de señalización RhoA/ROCK dependiente de la activación por Tgf $\beta$ 1 no está activa<sup>98</sup>.

La ausencia de expresión significativa en el grupo de ADSC-14d podría indicar que: 1) su papel en fases más avanzadas y fibróticas es menos relevante ó 2) que simplemente se requiere más tiempo para detectar un aumento significativo de su expresión, teniendo en cuenta que la expresión de Vegf en MSC trasplantadas en otros tejidos tiene lugar sobre los 21 días después del trasplante<sup>99</sup> ó 3) que su expresión está inactivada por la activación de la vía de señalización RhoA/ROCK dependiente de Tgf $\beta$ 1.

Este último punto cobra aún más fuerza, teniendo en cuenta que **Tgf $\beta$ 1** es una proteína que pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta de las citoquinas. Es una proteína de secreción que lleva a cabo diversas funciones en la célula, como el control del crecimiento celular, proliferación celular, procesos de diferenciación y apoptosis<sup>91</sup>. Se ha descrito que Tgf $\beta$ 1, además, es capaz de estimular directamente a los fibroblastos y miofibroblastos e inducir FP<sup>92</sup> por lo que sus actividades están íntimamente relacionadas con la generación de enfermedad obstructiva pulmonar e hipertensión pulmonar. Es interesante destacar que, en un gran número de células, Tgf $\beta$ 1 es capaz de provocar una respuesta de estrés oxidativo, la cual parece estar asociada con la actividad del factor de transcripción TIEG (Tgf $\beta$ 1-inducible early-response gene)<sup>93</sup> y que probablemente la acción de Tgf $\beta$ 1 como pro-fibrótico cuando se expresa en el tejido pulmonar con FP no tiene relación con sus acciones cuando es expresado por las ADSC durante la fase de reparación tisular. De hecho, en nuestro estudio, observamos un incremento significativo de la expresión de Nfkb en el grupo tratado con BLM, en relación con su acción profibrótica y además su expresión se incrementó significativamente con el trasplante de ADSC-14d, mientras que la expresión de Vegf no mostró diferencias significativas como hemos comentado previamente, lo cual apoya la teoría de que la vía de actuación de Tgf $\beta$ 1 podría ser la activación de la vía de señalización RhoA/ROCK que permite la diferenciación de las MSC en miofibroblastos inhibiendo la expresión de Vegf<sup>98</sup>.

**Nfkb** es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN, se encuentra en la mayoría de células animales y está implicado en la respuesta celular frente a estímulos como el estrés oxidativo, las citoquinas, la radiación ultravioleta, las LDL oxidadas y antígenos bacterianos o virales<sup>84</sup>. Es un factor de transcripción nuclear con importante actividad proinflamatoria que, una vez activado, se traslada al núcleo donde estimula la expresión de genes implicados en una amplia variedad de funciones biológicas, incluida la síntesis de citocinas proinflamatorias como IFNg, TNF $\alpha$  e IL-8. Su activación se ha asociado con numerosas enfermedades inflamatorias y se ha podido comprobar que existe un incremento de su activación en la FP<sup>85</sup>. Su regulación defectuosa está relacionada con el cáncer, las enfermedades inflamatorias y autoinmunes, shock séptico, infecciones virales o un desarrollo inmune inadecuado<sup>86</sup>, de forma que se ha observado que en muchos cánceres hay una sobre-activación del factor Nfkb y que su inhibición limita la proliferación de células cancerosas y la respuesta inflamatoria; por lo que los métodos de inhibición de



la señalización de Nfkb tienen un gran interés terapéutico en cánceres y enfermedades inflamatorias como pudiera ser la FPI<sup>87-88</sup>. Cuando las células madre mesénquimales están expuestas a daño celular por la presencia de TNF, endotoxinas y la hipoxia, incrementan la activación de Nfkb, ERK (extracellular signal-regulated kinase), y JNK (quinasas c-Jun N-terminal) y Nfkb inhibe la expresión de Vegf, Fgf2 y Hgf<sup>100</sup>. En nuestro estudio observamos un incremento significativo de la expresión de Nfkb en el grupo tratado con BLM, en relación con su acción proinflamatoria en FP. A su vez, el grupo tratado con ADSC-2d mostró menor expresión de Nfkb y un aumento significativo de Vegf, mientras que el grupo de ADSC-14d mostró un aumento significativo de Nfkb y una disminución de la expresión de Vegf, lo que evidencia que la relación inversa descrita en MSC también está presente en las ADSC, siendo la primera vez que se describe esta relación en ADSC y en tejido pulmonar, lo que podría traducir que se trata de la expresión de una forma universal de comportamiento de las SC ante la lesión celular y tisular, dependiendo de la fase de regeneración en la que se encuentren el tejido, no bien conocida aún.

**IL6** es una glicoproteína de pequeño tamaño (21 KDa), localizada en el cromosoma 7, una citoquina producida por las células del sistema inmunológico innato, los macrófagos, células T, células endoteliales y también fibroblastos como potente inductor de la fase de respuesta aguda. Su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF $\alpha$ . Su acción proinflamatoria y de su acción profibrótica han sido descritas en modelos experimentales de FP inducida con BLM<sup>89</sup>. La IL6 ha sido también conocida como interferon-R2 (IFN-R2) o B-cell stimulating factor-2 (BSF-2) y es idéntica al factor estimulante de hepatocitos (HSF), lo que prueba su capacidad para estimular los hepatocitos y producir proteínas de la fase aguda, como el fibrinógeno y la alfa-1-antitripsina entre otros<sup>79</sup>. En nuestro estudio, el trasplante de ADSC-14d disminuyó significativamente su expresión hasta el nivel de los animales controles reduciendo de forma importante su acción profibrótica.

**IL1** es una citoquina producida por múltiples estirpes celulares, principalmente por macrófagos activados. Se produce en grandes cantidades como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés. Es un mediador clave en la respuesta inflamatoria ocasionando fiebre, neutrofilia y producción de proteínas de fase aguda. Posee numerosas actividades biológicas, como son la proliferación de linfocitos T a través de la liberación de IL-2, la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, actuar como factor de crecimiento de los fibroblastos, como pirógeno endógeno, y liberar prostaglandinas y colagenasas. Se ha descrito que los macrófagos alveolares producen IL-6 e IL-1 y los fibroblastos pulmonares producen IL-6. A su vez, la producción de IL-1 por los monocitos regula la expresión de IL6 por los fibroblastos pulmonares, de forma que ambas están íntimamente entrelazadas<sup>89</sup> como hemos comentado previamente. En nuestro estudio no se observaron cambios significativos en su expresión con el trasplante de ADSC en fases precoces ni tardías de la instauración de la enfermedad.

El gen **Col4** se localiza en el brazo largo del cromosoma 16 (16q12.5) y codifica una proteína de la membrana basal que actúa como constituyente estructural de la matriz extracelular, el colágeno tipo IV. Dicho colágeno se encuentra implicado en la diferenciación de las células epiteliales, la organización de la membrana basal, la morfogénesis de los vasos sanguíneos y sus alteraciones se han asociado con múltiples enfermedades: angiopatía hereditaria, nefropatía, aneurismas y calambres musculares, sistema nervioso central con vasos de pequeño calibre y con hemorragia. Las ratas que recibieron un tratamiento previo con un inhibidor específico para la enzima inducible que produce óxido nítrico (iNOS) mostraron menores niveles de expresión de Col4. Por otro lado, la señalización generada por el óxido nítrico potencia la expresión de Tgf $\beta$ 1 TIMP-1 y HSP47 en los fibroblastos pulmonares que juegan un papel importante en la fibrosis pulmonar. En nuestro estudio, su expresión fue significativamente menor en el grupo al que se le trasplantaron ADSC-14d, en relación con el efecto antifibrótico y regenerativo de las ADSC.

Conviene puntualizar que la capacidad del organismo para articular una reacción inflamatoria en respuesta a agresiones tisulares es esencial para la supervivencia del organismo. De modo que para comprender la patogénesis de la fibrosis pulmonar es fundamental entender las causas que alteran una reacción, esencialmente homeostática, como es la inflamación. De hecho, la FPI es la expresión de la enfermedad como la continuación de los procesos fisiológicos más allá de los límites requeridos para una función homeostática. Tan pronto como el pulmón es dañado, se inician mecanismos de reparación, donde las mismas citoquinas y factores de crecimiento juegan un papel central en la orquestación de estos mecanismos de inflamación-reparación, en constante tendencia al desequilibrio para producir o bien enfermedad o bien reparación.

Finalmente, a modo de resumen podemos considerar que en nuestro estudio, el tratamiento con ADSC ha disminuido de forma significativa el grado de fibrosis y de lesión pulmonar inducido por la BLM tanto en fases precoces como establecidas de la enfermedad, debido a la inducción en el organismo de un efecto antiinflamatorio e inmunomodulador y probablemente antioxidante a nivel local. Estos resultados abren una nueva alternativa de tratamiento y/o prevención de la FP. La expresión de los genes estudiados Hsp27, Nfkb, Vegf, Tgf $\beta$ 1, Il6 y Col4 podrían servir como biomarcadores de respuesta al tratamiento con ADSC, o como potenciales dianas para el desarrollo de terapias génicas.

Dado que la administración de ADSC por vía respiratoria es una técnica sencilla, desde el punto de vista traslacional podría suponer una nueva opción potencialmente aplicable en esta patología. Los futuros estudios experimentales y los ensayos clínicos que deven-gan nos ayudarán a confirmar la aplicabilidad terapéutica del trasplante de ADSC en la FP.



---

---

# VIII

## CONCLUSIONES



## 1

*El modelo de desarrollo de FP en ratas mediante la instilación traqueal de BLM utilizado en esta tesis doctoral, ha demostrado ser un buen modelo experimental de estudio de la enfermedad dada:*

- 1) La aparición de lesiones pulmonares similares a las observadas en los enfermos con FPI en un grado significativamente mayor que el observado en el grupo control y Sham.*
- 2) La progresiva pérdida de peso de los animales en relación con la instauración de la enfermedad.*
- 3) La ausencia de mortalidad entre los animales de los grupos tratados alcanzando los 28 días de supervivencia.*
- 4) La expresión significativa de los genes relacionados con la FP en el grupo de animales tratados con BLM.*

## 2

*El trasplante traqueal de ADSC, no utilizado antes en modelos experimentales de FP ha disminuido de forma significativa el grado de FP cuando el trasplante se ha realizado en fases precoces de la enfermedad (2 días) o en fases de enfermedad instaurada (14 días). La administración traqueal permitió la utilización de dosis más bajas de ADSC ya que éstas actúan directamente sobre el tejido pulmonar dañado sin que exista la pérdida celular de la vía venosa por retención capilar pulmonar.*

## 3

*Estos hechos, adquieren un valor adicional teniendo en cuenta que:*

- 1) El análisis histológico se realizó de forma ciega respecto al grupo de procedencia de las muestras.*
- 2) Los resultados negativos del análisis microbiológico en todas las muestras descartan que la gradación del proceso de FP pudiera haberse debido a infecciones intercurrentes.*
- 3) En la mayoría de los estudios descritos, los animales son sacrificados a los 14 días.*

4

*El trasplante de ADSC ha disminuido de forma significativa la expresión de Hsp27 cuando éstas se administraron en fases precoces (2 días) y de enfermedad establecida (14 días), lo que indica que o está implicada en el desarrollo de FP y que el efecto protector de las ADSC reduce su expresión o bien Hsp27 se expresa ante el daño pulmonar en un intento por proteger a las células, de forma que su expresión disminuiría con las ADSC al disminuir la lesión pulmonar. En nuestra opinión, el papel real de Hsp27 en la FP es controvertido por lo que se requieren más estudios.*

5

*El trasplante de ADSC-2d incrementó de forma significativa la expresión de Vegf, en probable relación con: 1) el proceso de regeneración tisular, 2) el estímulo migratorio de los monocitos y macrófagos, 3) la estimulación de la neovascularización y su diferenciación hacia células endoteliales dependientes de VEGF, cuando la vía RhoA/ROCK dependiente de activación por Tgfβ1 no está activa.*

*La ausencia de expresión significativa en el grupo de ADSC-14d podría indicar que: 1) su papel en fases más avanzadas y fibróticas es menos relevante ó 2) que simplemente se requiere más tiempo para detectar un aumento significativo de su expresión, teniendo en cuenta que la expresión de Vegf en MSC trasplantadas en otros tejidos tiene lugar sobre los 21 días después del trasplante ó 3) que su expresión está inactivada por la activación de la vía de señalización RhoA/ROCK dependiente de Tgfβ1.*

6

*El grupo tratado con ADSC-2d mostró menor expresión de Nfkb y un aumento significativo de Vegf, mientras que con ADSC-14d se observó un aumento significativo de Nfkb y una disminución de Vegf, lo que evidencia una relación inversa que se describe por primera vez en ADSC y en tejido pulmonar.*

7

*El trasplante de ADSC-14d disminuyó significativamente la expresión de IL6 hasta el nivel de los animales controles reduciendo de forma importante su acción profibrótica descrita en FP.*

*No se observaron cambios significativos en la expresión de IL1 con el trasplante de ADSC.*

8

*La expresión de Col4 fue significativamente menor en el grupo al que se le trasplantaron ADSC-14d, en relación con el efecto antifibrótico y regenerativo de las ADSC.*

9

*Estos resultados abren una nueva alternativa de tratamiento y/o prevención de la FP.*

*La expresión de los genes estudiados Hsp27, Nfkb Vegf, Tgf $\beta$ 1, Il6 y Col4 podría usarse como biomarcador de respuesta al tratamiento con ADSC.*

10

*Desde el punto de vista traslacional el trasplante de ADSC por vía traqueal supone una nueva nueva opción potencialmente aplicable al ser humano.*

*Los futuros estudios experimentales y los ensayos clínicos que devengan nos ayudarán a confirmar esta singular aplicabilidad terapéutica de las ADSC en la fibrosis pulmonar.*





---

---

# **IX**

## **BIBLIOGRAFÍA**



- 1** American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment; joint statement of the American Thoracic Society and the European Respiratory Society. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:646-664.
- 2** Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence –based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 183:788-824.
- 3** Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174:810-816.
- 4** Marcos PJ, Valenzuela C, Ancochea J. De la exclusion a la certidumbre. El recorrido hacia el diagnóstico de la fibrosis pulmonar idiopática. *Arch. Bronconeumología* 2012; 48 Supl. 2:7-12.
- 5** Nalysnyk L, Cid –Ruzafa J, Rotella P and Esser D. *Eur Respir Rev* 2012; 21 (126):355 - 61.
- 6** Selman M, Carrillo G, Estrada A, Mejia M, Becerril C, Cisneros J et al. Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS ONE* 2007; 2:e482.
- 7** Mcneal K, Schwartz DA. The genetics and environmental causes of pulmonary fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.* 2012; 9:120- 125.
- 8** Lee JS, Ryu JH, Elicker BM, Lydell CP, Jones KD, Wolters PJ et al. Gas-troesophageal reflux therapy is associated with longer survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 184:1390-1394.
- 9** Nathan SD, Shlobin OA, Weir N, Ahmad S, Kaldjob JM, Battle E, et al. Long-term Course and Prognosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis in the New Millennium. *Chest.* 2011;140:221–9.
- 10** Lamas DJ, Kawut SM, Bagiella E, Philip N, Arcasoy SM, Lederer DJ. Delayed access and survival in idiopathic pulmonary fibrosis: a cohort study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:842–7.
- 11** Rosas IO, Richards TJ, Konishi K et al. MMP1 and MMP7 as potential peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med.* 2008; 5:0623-0633, e93.

- 12** Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, Zhang Y, Gibson K, Lokshin SF et al. Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases. *Am J Resp Crit Care Med.* 2002; 165:378-381.
- 13** Moeller A, Gilpin SE, Ask K, Cox G, Cook D, Gauldie J et al. Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med.* 2009; 179:588-594.
- 14** Van den Blink B, Wijsenbeek MS, Hoogsteden HC. Serum biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther.* 2010; 23:515-520.
- 15** Leslie KO, Gruden JF, Parish JM, Scholand MB. Transbronchial biopsy interpretation in the patient with diffuse parenchymal lung disease. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; 131:407-423.
- 16** Babiak A, Hetzel J, Krishna G, Fritz P, Moeller P, Balli T et al. Transbronchial cryobiopsy: a new tool for lung biopsies. *Respiration* 2009; 78:203-208.
- 17** Hansell DM, Bankier AA, MacMahon H, McLoud TC, Muller NL, Remy J. Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging. *Radiology* 2008; 246:697-722.
- 18** Mahler DA, Weinberg DH, Wells CK, Feinstein AR. The measurement of dyspnea. Contents, interobserver agreement, and physiologic correlates of two new clinical index. *Chest* 1984; 85:751-758.
- 19** Nishiyama O, Taniguchi H, Konodoh Y, Kimura T, Kato K, Kataoka K et al. A simple assessment of dyspnea as a prognostic indicator in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2010; 36:1067-1072.
- 20** Birring SS, Pruden B, Carr AJ, Singh SJ, Morgan MDL, Pavord ID. Development of a symptom specific health status measure for patients with chronic cough: Leicester Cough-Questionnaire (LCQ). *Thorax* 2003; 58:339-343.
- 21** Yorke J, Jones PW, Swigris JJ. Development and validity testing of an IPF-specific version of the St George's respiratory questionnaire. *Thorax* 2010; 65:921-926.
- 22** Ley B, Collard HR, King TE, Jr. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med.* 2011; 183:431-40.

- 23** Mura M, Porretta MA, Bargagli E, Sergiacomi G, Zompatori M, Sverzellati N et al. Predicting survival in newly diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis: a 3-year prospective study. *Eur Respir J*. 2012; 40:101-9.
- 24** du Bois, R.M., Weycker D, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Kartashov A et al. Forced vital capacity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: test properties and minimal clinically important difference. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:1382-9.
- 25** du Bois, R. M., D. Weycker, C. Albera, W. Z. Bradford, U. Costabel, A. Kartashov, L. Lancaster, P. W. Noble, S. A. Sahn, J. Swarcberg, M. Thomeer, D. Valeyre, and T. E. King, 2011b, Six-minute-walk test in idiopathic pulmonary fibrosis: test validation and minimal clinically important difference: *Am J Respir Crit Care Med*, v. 183, p. 1231-7.
- 26** Yingze Ahang and Naftali Kamiski. Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2012;18:441-446.
- 27** Seibold MA, Wise AL, Speer MC, et al. A common MUC5B promoter Polymorphism with IPF. *N Engl J Med* 2011;364:1503-1512.
- 28** Song JW, Do KH, Jang SJ, Colby TV, Han S, Kim DS. Blood Biomarkers MMP-7 and SP-A: Predictors of Outcome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 2013; 143:1422-1429.
- 29** Huang H, Peng X, Nakajima J. Advances in the study of biomarkers of idiopathic pulmonary fibrosis in Japan. *BioScience Trends* 2013; 7: 172-177.
- 30** Maher TM. PROFILEing Idiopathic Pulmonary Fibrosis: rethinking bio-marker discovery. *Eur Respir Rev* 2013; 22: 148-152.
- 31** Lee JS, McLaughlin S, Collard HR. Comprehensive care of the patient with idiopathic pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2011; 17:348-54.
- 32** Cottin V. Changing the idiopathic pulmonary fibrosis treatment approach and improving patient outcomes. *Eur Respir Rev*. 2012; 21:161-67.
- 33** Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet* 2011; 377:1760-69.

- 34** King TE Jr, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014;370:2083–92.
- 35** Costabel U, Albera C, Cohen A, Bradford W, King TE Jr, Noble P, et al. The long-term safety of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): Interim data from the RECAP extension study. Abstract presented at the European Respiratory Society Annual Congress. 2011.
- 36** Taniguchi H, Ebina M, Kondoh Y, Azuma A, Ogura T, Taguchi Y et al. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2010; 35:1079–87.
- 37** Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis: *N Engl J Med*, v. 370, p. 2071–82.
- 38** Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 183:788–824.
- 39** Raghu G, Anstrom KJ, King TE Jr, Lasky JA, Martinez FJ. Prednisone, Azathioprine, and N-Acetylcysteine for Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366:1968–77.
- 40** Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network. Randomized trial of acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014;370:2093–101.
- 41** Douglas WW, Ryu JH, Schroeder DR. Idiopathic pulmonary fibrosis: Impact of oxygen and colchicine, prednisone, or no therapy on survival. *American journal of respiratory and critical care medicine*. American Thoracic Society New York, NY; 2000 Apr;161(4 Pt 1):1172–8.
- 42** J.L. Hook, S.M. Arcasoy, D. Zimmel et al. Titrated oxygen requirement and prognostication in idiopathic pulmonary Fibrosis. *Eur Respir J* 2012; 39: 359–365.
- 43** Christopher J. Lettieri et al. The distance-saturation product predicts mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine* (2006) 100, 1734–1741.
- 44** George TJ, Arnaoutakis GJ, Shah AS. Lung transplant in idiopathic pulmonary fibrosis. *Arch Surg*. 2011; 146:1204–1209.

- 45** Arango Tomás EA, Algar Algar FJ, Cerezo Madueño F, Salvatierra Velázquez A. Evolution and Risk Factors for Early Mortality After Lung Transplantation for Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Experience of 20 Years. *Transplant Proc.* 2015 Nov;47(9):2656-8. doi:10.1016/j.transproceed.2015.09.048.
- 46** An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Key Concepts and Advances in Pulmonary Rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 188, Iss. 8, pp e13–e64, Oct 15, 2013.
- 47** Nishiyama O, Kondoh Y, Kimura T, et al. Effects of pulmonary rehabilitation in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 2008;13:394–399.
- 48** Huppmann P, Szczepanski B, Boensch M, et al. Effects of inpatient pulmonary rehabilitation in patients with interstitial lung disease. *Eur Respir J.* 2013; 42:444–453.
- 49** Holland AE, Hill CJ, Conron M, et al. Short term improvement in exercise capacity and symptoms following exercise training in interstitial lung disease. *Thorax* 2008;63: 549–554.
- 50** Kozu R, Senjyu H, Jenkins SC, et al. Differences in response to pulmonary rehabilitation in idiopathic pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 2011;81:196–205.
- 51** Vainshelboim B, Oliveira J, Fox BD, et al. Long-term effects of a 12-week exercise training program on clinical outcomes in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung* 2015; 193:345-54.
- 52** Dowman L, Hill CJ, Holland AE. Pulmonary rehabilitation for interstitial lung disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Oct 6; 10:CD006322.
- 53** Selman, M. Pardo, A. Revealing the Pathogenic and Aging-related Mechanisms of the Enigmatic Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Integral Model *Am J Respir Care Med* May 15, 2014; vol 189, Iss 10, 1161-1172
- 54** Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (Safe-Cell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. Beltrami AP, editor. *PLoS ONE. Public Library of Science*; 2012;7:e47559.



- 55 Tzouvelekis A, Paspaliaris V, Koliakos G, et al. A prospective, non-randomized, no placebo-controlled, phase Ib clinical trial to study the safety of the adipose derived stromal cells-stromal vascular fraction in idio-pathic pulmonary fibrosis. *J Transl Med. BioMed Central Ltd*; 2013;11:171.
- 56 Serrano-Mollar A, Nacher M, Gay-Jordi G, Closa D, Xaubet A, Bulbena O. Intratracheal transplantation of alveolar type II cells reverses bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176:1261-8.
- 57 Rajan Jain et al. (NATURE COMMUNICATIONS | 6:6727 | DOI: 10.1038/ncomms7727 |www.nature.com/naturecommunications).
- 58 Serrano-Mollar A, Gay-Jordi G, Guillaumat-Prats R, Closa D, Hernandez- Gonzalez F, Marin P, Burgos F, Martorell J, Sánchez M, Ar-guis P, Soy D, Bayas JM, Ramirez J, Tetley TD, Molins L, Puig de la Bella-casa J, Rodríguez-Villar C, Rovira I, Fiblà JJ, Xaubet A, for the Pneumocy-te Study Group, Safety and Tolerabili-ty of Alveolar Type II Cell Transplantation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *CHEST* (2016),doi:10.1016/j.chest.2016.03.021.
- 59 Macneal, K., and D. A. Schwartz, 2012, *The Genetic and Environmental Causes of Pulmonary Fibrosis: Proceedings of the American Thoracic Society*, v. 9, p. 120-125.
- 60 Marta Fierro-Fernández, Óscar Busnadiego, Pilar Sandoval, Cristina Espinosa-Díez, et al. *EMBO Reports* (2015) 16: 1358–1377.
- 61 Cancer pain relief and palliative care. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 1990;804:1-75.
- 62 Gomes B, Calanzani N, Curiale V, et al. Effectiveness and cost-effectiveness of home palliative care services for adults with advanced illness and their caregivers. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Jun 6;6:CD007760.
- 63 Horton MR, Santoprieto V, Mathew L, Horton KM, Polito AJ, Liw MC et al. Thalidomide for the treat-ment of cough in idiopathic pulmonary fibrosis: a randomised trial. *Ann In-tern Med*. 2012; 157:398-406.
- 64 Allen S, Raut S, Woollard J, Vasallo M. Low dose diamorphine reduces breathlessness without caus-ing a fall in oxygen saturation in el-derly patients with end-stage idiopathic pulmonary fibrosis. *Palliat Med*. 2005; 19:128-130.

- 65** Egan JJ. Follow-up and nonpharmacological management of the idiopathic pulmonary fibrosis patient. *Eur Respir Rev.* 2011; 20: 114-117.
- 66** Vianello A, Pipitone E. Noninvasive ventilation in patients with idiopathic pulmonary fibrosis is not a futile intervention! *J Crit Care.* 2014;29:1129.
- 67** Blackwell TS, Tager AM, Borok Z, Moore BB, Schwartz DA, Anstrom KJ et al. Future directions in idiopathic pulmonary fibrosis research. An NHLBI workshop report. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Jan 15;189(2):214-22.
- 68** Ashcroft T, et al. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 1988;41:467-470.
- 69** Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, Illgenwilcke B: Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units *Laboratory Animals* 2002, 36:20-42.
- 70** Zúñiga JM, Tur Marí JA, Milocco SN, Piñeiro R. *Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal.* Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 2001.
- 71** Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1992). *principles of humane experimental technique.*
- 72** Tzouvelekis A. et al. Stem cell therapy in pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2011 Sep;17(5):368-73. doi: 10.1097/MCP.0b013e328348744f.
- 73** Sang Hoon Lee et al. The effect of adipose stem cell therapy on pulmonary fibrosis induced by repetitive intratracheal bleomycin in mice. *Experimental Lung Research*, 40, 117–125, 2014.
- 74** Maliheh Ghadiri, Paul M Young & Daniela Traini (2016) Cell-based therapies for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) disease, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 16:3, 375-387, DOI: 10.1517/14712598.2016.1124085.
- 75** Michael Kirwan, Inderjeet Dokal. Dyskeratosis congenita, stem cells and telomeres. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Apr; 1792(4): 371–379.
- 76** Allison, R et al. hTERT mutations associated with idiopathic pulmonary fibrosis affect telomerase activity, telomere length, and cell growth by distinct mechanisms. *Aging Cell* 2012; 11, pp482-490.

- 77** Armanios, M. Blackburn, E. The telomere syndrome Nat Rev Genet. 2012 Octubre; 13 (10); 693-704.
- 78** Armanios, M. Telomerase and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Mutat Resp. 2012 Febrero. 730 (1-2); 52-58.
- 79** Fibrosis pulmonar: perspectivas actuales. M. Jordana, A. Xaubet, J. Gauldie. Arch. Bronconeumol.1989;25:336-44
- 80** Wettstein G, Bellaye PS, Kolb M, Hammann A, Crestani B, Soler P, et al. Inhibition of Hsp27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. FASEB J. 2013 Apr;27(4):1549-60.
- 81** Vidyasagar A, Reese SR, Hafez O, Huang LJ, Swain WF, Jacobson LM, et al. Tubular expression of heat-shock protein 27 inhibits fibrogenesis in obstructive nephropathy. Kidney Int. 2012 Jan;83(1):84-92.
- 82** Santana-Rodriguez N, Garcia-Herrera R, Clavo B, Llontop P, Ponce-Gonzalez MA, Villar J, et al. Searching for novel molecular targets of chronic rejection in an orthotopic experimental lung transplantation model. J Heart Lung Transplant. 2012 Feb;31(2):213-21.
- 83** Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. (Oct de 2007). «Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition». Cell Signal. 19 (10): 2003-2012.
- 84** Gilmore TD (2006). «Introduction to NF-κB:players, pathways,perspectives». Oncogene 25 (51): 6680-4.
- 85** Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. Thorax. 1998 Jul;53(7):601-12.
- 86** Albeni BC, Mattson MP (2000). «Evidence for the involvement of TNF and NF-κB in hippocampal synaptic plasticity». Synapse 35 (2): 151-9;
- 87** Garg A, Aggarwal BB (June de 2002). «Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development». Leukemia 16 (6): 1053-68.
- 88** Sethi G, Sung B, Aggarwal BB (January de 2008). «Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside». Exp. Biol. Med. (Maywood) 233 (1): 21-31.

- 89** Saito F, Tasaka S, Inoue K, Mi-yamoto K, Nakano Y, Ogawa Y, et al. Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 May;38(5):566-71.
- 90** Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, Tichelaar JW, Bry K. Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Apr;32(4):311-8.
- 91** Ghadami M, Makita Y, Yoshida K, Nishimura G, Fukushima Y, Wakui K, Ikegawa S, Yamada K, Kondo S, Niikawa N, Tomita H (January de 2000). «Genetic mapping of the Ca-murati-Engelmann disease locus to chromosome 19q13.1-q13.3». *Am. J. Hum. Genet*. 66 (1): 143-7.
- 92** Hetzel M, Bachem M, Anders D, Trischler G, Faehling M. Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Lung*. 2005 Jul-Aug;183(4):225-37.
- 93** Ribeiro A, Bronk SF, Roberts PJ, Urrutia R, Gores GJ. The transforming growth factor beta(1)-inducible transcription factor TIEG1, mediates apoptosis through oxidative stress. *Hepatology*. 1999 Dec;30(6):1490-7.
- 94** Tashiro J et al. Therapeutic benefits of young, but not old, adipose-derived mesenchymal stem cells in a chronic mouse model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Translational Research*. 2015 Dec ;166 (6):554-567.
- 95** Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cell (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:2277-2286.
- 96** Adas G Langenbecks *Arch Surg*. 2016 Apr 19.
- 97** Berendsen AD1, Olsen BR. *J Histochem Cytochem*. 2014 Feb;62(2):103-8.
- 98** Li C, *Nat Commun*. 2016 Apr 29;7:11455.
- 99** Man AJ, *Cell Mol Bioeng*. 2016 Mar 1;9(1):96-106
- 100** Crisostomo PR, *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Mar;294(3):C675-82. doi: 10.1152/ajpcell.00437.2007. Epub 2008 Jan 30.
- 101** Ren X. *Nat Biotechnol*. 2015 Oct;33(10):1097-102



---

---

# **X**

## **ANEXOS**





La Dra. Estrella Fernández Fabrellas, Secretaria General de la “Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica” (SEPAR)

**CERTIFICA:**

Que D. **Daniel López Fernández**, con DNI 33925258M, es el investigador principal del proyecto premiado en la

**Convocatoria de Becas EPID Futuro 2013 de SEPAR:**

**Título:** Efectos del trasplante de células madre y la transfección de HSP27 sobre un modelo experimental de fibrosis pulmonar.

**Dotación:** 6.000 €

**Duración:** Junio 2013-Diciembre 2015 (finalizado)

Y para que conste a los efectos oportunos libra la presente certificación en Barcelona, a tres de mayo de dos mil dieciséis.

SOCIEDAD ESPAÑOLA  
DE NEUMOLOGÍA Y  
CIRUGÍA TORÁCICA  
SEPAR





مستشفى الملك فيصل التخصصي ومركز الأبحاث  
King Faisal Specialist Hospital & Research Centre  
مؤسسة عامة - Gen. Org.



INSTITUTO UNIVERSITARIO DE  
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS Y  
SANITARIAS

**Dr. NORBERTO SANTANA RODRÍGUEZ, MÉDICO ESPECIALISTA EN CIRUGÍA TORÁCICA, DOCTOR EN MEDICINA, JEFE CIRUGÍA TORÁCICA DEL KING FAISAL SPECIALIST HOSPITAL & RESEARCH CENTER E INVESTIGADOR PRINCIPAL DE LA LÍNEA DE MEDICINA REGENERATIVA DEL GRUPO BIOPHARM DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS Y SANITARIAS (IUIBS).**

Hace constar que:

El presente proyecto de investigación que ha servido como base para la realización de esta tesis doctoral pertenece a la línea de Investigación de Medicina Regenerativa en Fibrosis Pulmonar de nuestro grupo de investigación cuyo propietario intelectual e investigador principal es el Dr. Norberto Santana Rodríguez, siendo el coordinador del grupo Biopharm el profesor Dr. Leandro Fernández Pérez.

Dicho proyecto de investigación ha sido parcialmente financiado con fondos propios y con una Beca de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR).

El Dr. Norberto Santana Rodríguez, ha cedido libremente la información necesaria relativa al método y resultados de los experimentos a D. Daniel López Fernández para la realización de su tesis doctoral.

Para que ejerza los efectos oportunos expido el presente certificado en Riyadh, Arabia Saudi el 6 de Noviembre del 2017.

Atentamente:

Dr. Norberto Santana Rodríguez, MD, PhD.

Section Head of Thoracic Surgery. Department of Surgery. King Faisal Specialist Hospital and Research Center, Riyadh, Arabia Saudi.

Investigador Principal del IUIBS, Grupo Biopharm, Las Palmas de Gran Canaria, España.



**Ref. Autorización Utilización Diapositivas para Tesis Doctoral Dr. Daniel López Fernández. Universidad de las Palmas de Gran Canaria**

Estimado Dr. Lopez,

En referencia a su solicitud de la semana pasada, que nos remitió nuestro compañero Oscar Romero, para utilizar las imágenes contenidas en el correo de fecha 19 de enero, contenidas en una página web propiedad de Hoffman La Roche, para incluirlas como parte de su Tesis Doctoral sobre Fibrosis Pulmonar Idiopática.

Le informamos que tras solicitar dicho permiso a nuestro equipo internacional, nos autorizan a darle los permisos necesarios para su utilización como parte de la mencionada Tesis Doctoral.

Unicamente recordarle que solo podrán ser utilizadas, incluyendo en cada una de ellas las referencias correspondientes a cada uno de los artículos de donde han sido extraídos los datos que contienen y que en ningún caso se podrá utilizar como referencia la pagina web en las que estaban contenidas.

Para cualquier aclaración no dude en ponerse en contacto con nosotros

Un saludo

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "MS", on a light yellow background.

Marcos Sharaf  
Medical Unit Manager  
Speciality Care  
Roche Farma S.A.



Servicio  
Canario de la Salud

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE  
GRAN CANARIA DOCTOR NEGRÍN



Comité Ético  
de Experimentación  
y Bienestar Animal  
Unidad de Investigación



Gobierno  
de Canarias

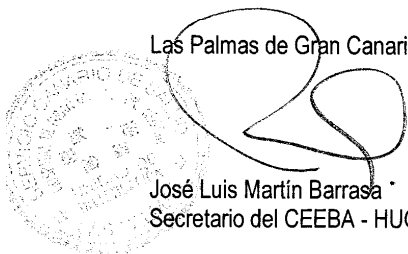
### Informe del Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal del Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín

José Luis Martín Barrasa como a Secretario del Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín (CEEBA - HUGCDN).

#### CERTIFICA:

Que el Procedimiento que lleva por título ***"Prevención de la Fibrosis pulmonar (VALORACIÓN DEL TRATAMIENTO MEDIANTE TRANSFECCIÓN DE HSP27, OZONO Y CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE FIBROSIS PULMONAR INDUCIDA CON BLEOMICINA)"***, presentado por el investigador **Dr. Norberto Santana Rodríguez**, ha sido presentado a este Comité el día 5 de octubre de 2011, para su próxima valoración. Informamos que a dicho procedimiento se le ha asignado el código de referencia **CEEBA-HUGCDN 013/2011**.

Las Palmas de Gran Canaria a 14 de noviembre de 2011



José Luis Martín Barrasa  
Secretario del CEEBA - HUGCDN

7/11/2017

ScholarOne Manuscripts

**Decision Letter (jim-2017-000494.R4)**

**From:** info.jim@bmj.com  
**To:** daniel.lopez@ulpgc.es

**CC:**

**Subject:** Journal of Investigative Medicine - Decision on Manuscript ID jim-2017-000494.R4

**Body:** 04-Nov-2017

Dear Mr. LÓPEZ FERNÁNDEZ

Manuscript ID jim-2017-000494.R4 - AIRWAY TRANSPLANTATION OF ADIPOSE STEM CELLS PROTECTS AGAINST BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS

I am pleased to inform you that your work has now been accepted for publication in the Journal of Investigative Medicine. All manuscript materials will be forwarded immediately to the production staff for placement in an upcoming issue.

Thank you for submitting your interesting and important work to the journal.

Please note that authors will be billed a publication charge of \$40/printed page unless you are a confirmed AFMR member, who are exempt from these charges. Authors will also be charged for color figures at \$400/article. Page charges and color charges will be billed by, and are payable to, the publisher.

If you have chosen to pay to have your article published under our Open Access option, please ensure that you pay the required fee within 48 hours so that we can process your article without delays. If you have selected our Open Access option, please be aware that your article will be published behind access controls if payment is not verified within 40 days from acceptance. If payment is received after publication, access controls will be removed once this has been verified. You can choose to pay by card or invoice, using our secure 3rd party online system.

For more details on our Open Access option please visit <http://journals.bmj.com/site/authors/openaccess.xhtml>.

BMJ has partnered with the Copyright Clearance Center to offer a payment method via their RightsLink system. If payment is due, you will receive a separate email from Copyright Clearance Centre with instructions on how to pay.

Your paper will be now sent for editing and typesetting and you will receive a proof to check in about 10 working days; please check your junk mail if you have not received your proof within this time.

When will we publish your article?

Most articles are published Online First in their final form (edited and typeset) about 3 weeks after acceptance. Online First publication establishes primacy for the work; the article is deposited with PubMed and is fully citable. For further details please visit: <http://group.bmj.com/products/journals/instructions-for-authors/online-first>. Publication in a subsequent print version of the journal is determined by the Editor in Chief.

Post publication

You will be sent a link to your article by email when it is published online and you will be able to track its usage. All articles have individual usage statistics that are updated monthly; these can be accessed from the "Article Usage Statistics" link in the "Services" section to the right of the article online.

We encourage you to sign up for content alerts so you don't miss anything published in Journal of Investigative Medicine – it only takes a few seconds and we only need your email address <http://jim.bmj.com/cgi/alerts/etoc>

Yours sincerely,

Dr. Michael McPhaul

7/11/2017

ScholarOne Manuscripts

Editor in Chief, Journal of Investigative Medicine  
<http://jim.bmj.com/>

**Date Sent:** 04-Nov-2017

